

**OPTIMASI VOLUME PELARUT ETANOL DAN LAMA
EKSTRAKSI JERAMI PADI HASIL BIODEGRADASI
JAMUR *Serpula lacrymans* TERHADAP
KADAR VANILIN**

SKRIPSI

**Oleh:
AHMAD AKBAR HAIDAR AFIQ
135100307111020**



**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**OPTIMASI VOLUME PELARUT ETANOL DAN LAMA
EKSTRAKSI JERAMI PADI HASIL BIODEGRADASI
JAMUR *Serpula lacrymans* TERHADAP
KADAR VANILIN**

**Oleh:
AHMAD AKBAR HAIDAR AFIQ
135100307111020**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknologi Pertanian**



**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul : Optimasi Volume Pelarut Etanol Dan Lama
Ekstraksi Jerami Padi Hasil Biodegradasi Jamur
Serpula lacrymans Terhadap Kadar Vanilin
Nama : Ahmad Akbar Haidar Afiq
NIM : 135100307111020
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

Pembimbing Pertama,

Pembimbing Kedua,

Irnia Nurika, STP, MP. PhD

NIP. 19740526 199903 2 001

Sri Suhartini, STP, M.Env.Mgt, PhD

NIP. 19810526 200312 2 001

Tanggal Persetujuan:

Tanggal Persetujuan:

.....

.....

LEMBAR PENGESAHAN

Judul : Optimasi Volume Pelarut Etanol Dan Lama
Ekstraksi Jerami Padi Hasil Biodegradasi Jamur
Serpula lacrymans Terhadap Kadar Vanilin
Nama : Ahmad Akbar Haidar Afiq
NIM : 135100307111020
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Nur Hidayat, MP
NIP. 19610223 198701 1 001

Pembimbing Pertama, Pembimbing Kedua,

Irnia Nurika, STP, MP, PhD. **Sri Suhartini, STP, M.Env.Mgt, PhD**
NIP. 19740526 199903 2 001 NIP. 19810526 200312 2 001

Ketua Jurusan,

Dr. Sucipto, STP, MP
NIP 19730602 199903 1 001

Tanggal Lulus TA:.....

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Jombang pada tanggal 10 Februari 1995 sebagai anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Triman Efendy dan Lilik Hasanah. Penulis menempuh pendidikan di MI PM Cukir (2001-2007), MTS Tsanawiyah Tebuireng (2007-2010), dan SMAN 1 Jombang (2010-2013). Tahun 2013, penulis diterima di Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Tahun 2018, penulis lulus sebagai Sarjana Teknologi Pertanian.

Selama menempuh pendidikan di SMAN 1 Jombang, penulis aktif dalam kegiatan Paskibra. Pada jenjang perguruan tinggi, penulis mengikuti Lembaga Kegiatan Mahasiswa (LKM) English for specific purpose (ESP) tahun pada tahun 2015-2016 menjadi staf bidang edukasi. Penulis pernah melaksanakan Praktek Kerja Lapang di bagian Quality Control PT. Sierad Produce tbk divisi pakan ternak, Sidoarjo tahun 2016 . Pada tahun 2017 penulis bergabung pada research group bimbingan Ibu Irnia Nurika STP, MP, Ph.D untuk melaksanakan proyek penelitian tahun ke-3 yang dibiayai melalui Bantuan Operasional PTN (BOPTN) DIKTI 2017 Kementrian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi.

*Alhamdulillah....
karya tulis ini saya persembahkan untuk
Ibu, Ayah, Adek Afif, Adek Aim
terima kasih untuk do'a, kesabaran, dan pengertiannya*

*terima kasih untuk teman satu tim proyek skripsi "Lignocellulose
Project":
Himawan, Ayu, Dwi yang selalu memberi semangat dan
bekerjasama
untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan laporan*

*terima kasih untuk kawan-kawanku keluarga PONPES barokah,
keluarga PPD
dan kakak tingkat se-tim proyek
yang telah memberikan doa, semangat dan dukungan*

PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama Mahasiswa : Ahmad Akbar Haidar Afiq
NIM : 135100307111020
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian
Judul TA : Optimasi Volume Pelarut Etanol Dan
Lama Ekstraksi Jerami Padi Hasil
Biodegradasi Jamur *Serpula lacrymans*
Terhadap Kadar Vanilin

Menyatakan bahwa,
TA dengan judul di atas merupakan karya asli penulis. Apabila
di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya
bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang, 3 Januari 2018
Pembuat Pernyataan,

Ahmad Akbar Haidar Afiq
NIM. 135100307111020

Ahmad Akbar Haidar Afiq. 135100307111020. Optimasi Volume Pelarut Etanol Dan Lama Ekstraksi Jerami Padi Hasil Biodegradasi Jamur *Serpula Lacrymans* Terhadap Kadar Vanilin. Pembimbing: Irnia Nurika, STP, MP, Ph.D. dan Sri Suhartini, STP, M.Env.Mgt, Ph.D.

RINGKASAN

Limbah jerami padi memiliki jumlah yang cukup besar yaitu sekitar 50,19 juta ton tahun 2016. Jerami padi mengandung lignoselulosa yang terdiri dari 32,1% selulosa, 24% hemiselulosa, dan 18% lignin. Lignin sendiri mengandung sejumlah komponen fenolik terutama *ferulic*, *p-coumaric*, *syringic*, *vanillic*, dan *p-hydroxybenzoic* yang dapat diturunkan menjadi senyawa aromatik seperti BTX (*benzene*, *toluene*, dan *xylene*), fenol, dan vanilin.

Proses degradasi lignin menjadi senyawa-senyawa tersebut dilakukan menggunakan mikroorganisme salah satunya jamur pelapuk coklat yaitu *Serpula lacrymans*. Hasil degradasi yang diamati berupa total gula reduksi (TGR), total soluble phenol (TSP), pH, dan susut berat kering. Proses selanjutnya berupa optimasi proses ekstraksi menggunakan metode *response surface method* (RSM) terdiri dari dua faktor yaitu volume pelarut etanol dan lama ekstraksi. Respon berupa kadar vanilin dan kandungan vanilin. Hasil solusi optimal akan diidentifikasi senyawa vanilin menggunakan LC-ESI-MS/MS.

Hasil uji parameter proses degradasi menunjukkan nilai rata-rata tertinggi adalah lama inkubasi 21 hari. Hasil optimal proses ini berupa volume pelarut sebesar 40,28 ml dan lama ekstraksi 249,11 menit untuk kedua respon. Kadar vanilin yang diperoleh sekitar 6,20% dan yield vanilin sekitar 2,59 µg/g dengan desirability 0,839 atau 83,9%. Identifikasi senyawa vanilin dengan LC-ESI-MS/MS didapatkan waktu retensi 2,53 menit namun tidak dapat diukur karena jumlahnya terlalu kecil.

Kata Kunci: Etanol, Lama ekstraksi, Lignin, dan Vanilin.

Ahmad Akbar Haidar Afiq. 135100307111020. *Optimization of Ethanol Volume and Extraction time on rice straw Biodegradation by *Serpula lacrymans* on Vanillin Levels.* Minor thesis. Supervisor: Irnia Nurika, STP, MP, Ph.D. and Sri Suhartini, STP, M.Env.Mgt, Ph.D.

SUMMARY

The potential of Rice straw wastes were 50.19 million tons in 2016. Rice straw is one of the lignocelluloses feedstock contains 32.1% cellulose, 24% hemicellulose, and 18% lignin. Lignin contains a number of phenolic components especially ferulic, p-coumaric, syringic, vanillic, and p-hydroxybenzoic which can be degraded into aromatic compounds such as BTX (benzene, toluene and xylene), phenols and vanillins.

*The degradation process of lignin into these compounds is carried out by microorganisms one of them is brown rot fungi, *Serpula lacrymans*. The observed parameters of degradation were total sugar reduction (TGR), total soluble phenol (TSP), pH, and weight loss. Ethanol volume and extraction time were optimized by response surface method (RSM) based on the highest TSP in order to obtain vanillin content and yield vanillin.*

The results indicated that for 21 days incubating rice straw resulted the highest TSP and TGR, the lowest pH while the highest weight loss values were obtain from 28 days incubation. The optimum result of this process was ethanol volume of 40.28 ml and extraction time of 249.11 min which produced vanillin with the content of 6.20% and the yield vanillin of 2.59 µg / g. The desirability value was 0.839 or 83.9%, which used to simultaneously optimize the multiple responses and represents the closeness of both responses to its ideal value. Vanillin compound was identified by LC-ESI-MS/MS showed 2.53 minute retention time but there was no detectable amount of vanillin.

Keywords: *Ethanol, Extraction time, Lignin, and Vanillin.*

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian dengan judul “**Optimasi Produksi Bioetanol Dan Senyawa Aromatik Melalui Biokonversi Lignoselulosa Dari Limbah Hasil Pertanian (*Biomass*) Menggunakan Isolat Jamur (*Brown Rot* dan *White Rot*)**” untuk tahun ke-3 yang dibiayai melalui Bantuan Operasional PTN (BOPTN) DIKTI 2016 Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur bagi Allah SWT yang selalu memberikan kemudahan, kelancaran, dan segala kemurahan-Nya sehingga penulis dapat menyusun laporan Tugas Akhir yang berjudul “Optimasi Volume Pelarut Etanol Dan Lama Ekstraksi Jerami Padi Hasil Biodegradasi Jamur *Serpula Lacrymans* Terhadap Kadar Vanilin”.

Penulis tidak lupa menyampaikan terimakasih kepada:

1. Irnia Nurika, STP, MP, Ph. D selaku dosen pembimbing I yang telah membimbing, memberikan koreksi, dan motivasi untuk penulisan laporan.
2. Sri Suhartini, STP, M.Env.Mgt. PhD. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, koreksi serta motivasi kepada penulis.
3. Dr. Ir. Nur Hidayat, MS selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat bermanfaat untuk penyempurnaan laporan.
4. Dr. Sucipto, STP, MP selaku Ketua Jurusan Teknologi Industri Pertanian yang telah mendukung dan mengesahkan tugas akhir ini.
5. Yuli Erna Widyasari selaku Laboran Laboratorium Bioindustri TIP yang telah memberikan masukan dan bantuan selama penelitian
6. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih belum sempurna. Penulis berharap laporan ini dapat memberikan banyak manfaat kepada semua pihak yang memerlukannya.

Malang, 3 Januari 2018

Ahmad Akbar Haidar Afiq

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| LEMBAR JUDUL..... | i |
| LEMBAR PERSETUJUAN | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN | iii |
| RIWAYAT HIDUP | iv |
| PERNAYTAAN KEASLIAN | vi |
| RINGKASAN..... | vii |
| SUMMARY | viii |
| KATA PENGANTAR | x |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR GAMBAR | xiv |
| LAMPIRAN | xv |
| BAB 1 PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan masalah..... | 3 |
| 1.3 Tujuan penelitian | 4 |
| 1.4 Manfaat penelitian | 4 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 Jerami padi | 5 |
| 2.2 Lignoselulosa..... | 6 |
| 2.2.1 Selulosa | 7 |
| 2.2.2 Hemiselulosa..... | 8 |
| 2.2.3 Lignin..... | 9 |
| 2.2.4 <i>Pretreatment</i> lignoselulosa secara biologi..... | 10 |
| 2.2.5 <i>Serpula lacrymans</i> | 11 |
| 2.3 Vanilin..... | 13 |
| 2.4 Ekstraksi | 14 |
| 2.5 <i>Response Surface Method</i> | 15 |
| 2.6 Penelitian terdahulu | 15 |
| 2.6.1 Pelarut etanol | 15 |
| 2.6.2 Lama Ekstraksi | 16 |
| 2.7 Hipotesa | 17 |
| BAB III METODE PENELITIAN..... | 19 |
| 3.1 Waktu dan tempat penelitian..... | 19 |
| 3.2 Alat dan bahan | 19 |
| 3.2.1 Alat | 19 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2 Bahan..... | 19 |
| 3.3 Rancangan penelitian..... | 20 |
| 3.4 Batasan masalah | 22 |
| 3.5 Pelaksanaan penelitian | 22 |
| 3.5.1 Preparasi bahan dan mikroorganisme..... | 24 |
| 3.5.2 <i>pretreatment</i> jerami padi | 26 |
| 3.5.3 Ekstraksi jerami padi | 26 |
| 3.5.4 Pengujian ekstrak dari jerami padi..... | 27 |
| 3.6 Pengujian kadar vanilin dengan spektrofotometer UV-Vis | 30 |
| 3.7 Pengujian kadar vanilin dengan <i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization tandem-Mass Spectrometry</i> | 31 |
| 3.8 Pengolahan dan analisis data..... | 32 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 33 |
| 4.1 Pengaruh lama inkubasi terhadap hasil degradasi jerami padi..... | 33 |
| 4.1.1 Total gula reduksi (TGR) hasil degradasi jerami padi | 33 |
| 4.1.2 <i>Total soluble phenol</i> (TSP) hasil degradasi jerami padi | 34 |
| 4.1.3 Susut berat (<i>weight loss</i>) hasil degradasi jerami padi | 36 |
| 4.1.4 Nilai pH hasil degradasi jerami padi | 38 |
| 4.2 Optimasi hasil degradasi jerami padi | 39 |
| 4.2.1 Respon kadar vanilin | 39 |
| 4.2.2 Respon <i>yield</i> vanilin | 43 |
| 4.2.3 Solusi optimal respon kadar vanilin | 46 |
| 4.3 Identifikasi senyawa vanilin | 47 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 51 |
| 5.1 Kesimpulan | 51 |
| 5.1 Saran | 51 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 53 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 2.1 Data tanaman padi berdasarkan beberapa indikator | 5 |
| Tabel 3.1 Taraf level faktor | 20 |
| Tabel 3.2 Rancangan penelitian menggunakan <i>Response surface method</i> | 21 |
| Tabel 3.3 Titik komposit pusat yang dicobakan | 21 |
| Tabel 3.4 Komposisi untuk gradient fase gerak identifikasi vanillin menggunakan LC-ESI-MS/MS | 32 |
| Tabel 4.1 Data optimasi respon persentase kadar vanilin hasil ekstraksi ampas pod kakao oleh jamur <i>serpula lacrymans</i> | 40 |
| Tabel 4.2 Data optimasi respon persentase <i>yield</i> vanilin hasil ekstraksi ampas pod kakao oleh jamur <i>serpula lacrymans</i> | 43 |
| Tabel 4.3 Batas optimasi respon kadar vanilin | 46 |
| Tabel 4.4 Hasil solusi optimal | 47 |
| Tabel 4.5 Kondisi analitis hasil LC-MS/MS senyawa fenolik ... | 50 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------------|--|----|
| Gambar 2.1 | Struktur lignoselulosa biomassa dengan area amorf dan kristal | 6 |
| Gambar 2.2 | Struktur molekul selulosa | 8 |
| Gambar 2.3 | Unit-unit penyusun hemiselulosa | 8 |
| Gambar 2.4 | Komponen dasar pembentuk lignin | 10 |
| Gambar 2.5 | Proses <i>pretreatment</i> lignoselulosa..... | 11 |
| Gambar 2.6 | Struktur molekul vanilin | 13 |
| Gambar 3.1 | Diagram alir penelitian | 22 |
| Gambar 4.1 | Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap rata-rata TGR jerami padi..... | 33 |
| Gambar 4.2 | Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap rata-rata TSP jerami padi | 35 |
| Gambar 4.3 | Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap rata-rata TSP dan pH jerami padi..... | 36 |
| Gambar 4.4 | Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap susut berat jerami padi | 37 |
| Gambar 4.5 | Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap pH jerami padi..... | 38 |
| Gambar 4.6 | Kurva hubungan volume etanol dan waktu ekstraksi terhadap respon kadar vanilin | 42 |
| Gambar 4.7 | Kurva hubungan volume etanol dan waktu ekstraksi terhadap respon <i>yield</i> vanilin | 45 |
| Gambar 4.8 | Kromatogram standar vanilin | 48 |
| Gambar 4.9 | Kromatogram sampel ekstrak jerami padi..... | 49 |

LAMPIRAN

| | | |
|--------------------|--|----|
| Lampiran 1 | Pembuatan media malt extract agar (MEA)..... | 65 |
| Lampiran 2 | Pembuatan grain spawn..... | 66 |
| Lampiran 3 | <i>Pretreatment</i> pada jerami padi | 67 |
| Lampiran 4 | Proses ekstraksi jerami padi menggunakan aquades | 68 |
| Lampiran 5 | Pembuatan larutan glukosa, larutan DNS, larutan DNS dengan glukosa, dan larutan DNS dengan aquades | 69 |
| Lampiran 6 | Pembuatan dan pengukuran larutan standar gula reduksi..... | 71 |
| Lampiran 7 | Pengukuran gula reduksi pada ekstrak jerami padi..... | 72 |
| Lampiran 8 | Pembuatan larutan asam galat dan sodium karbonat..... | 73 |
| Lampiran 9 | Pengukuran absorbansi larutan standar fenol | 74 |
| Lampiran 10 | Pembuatan dan pengukuran fenol pada ekstrak jerami padi | 75 |
| Lampiran 11 | Proses ekstraksi jerami padi menggunakan etanol | 76 |
| Lampiran 12 | Pengukuran absorbansi larutan standar vanilin .. | 77 |
| Lampiran 13 | Pembuatan dan pengukuran vanilin pada ekstrak jerami padi | 78 |
| Lampiran 14 | Hasil <i>fit summary</i> dan ANOVA dari analisa desain komposit terpusat kadar vanilin ... | 79 |
| Lampiran 15 | Hasil <i>fit summary</i> dan ANOVA dari analisa desain komposit terpusat <i>yield</i> vanilin | 81 |
| Lampiran 16 | Dokumentasi penelitian | 83 |

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman padi merupakan salah satu tanaman pangan yang banyak tersedia di Indonesia. Menurut data Kementerian Pertanian (2017), produksi padi meningkat dari 71,76 juta ton tahun 2015 menjadi 75,48 juta ton tahun 2016. Peningkatan jumlah produksi tersebut juga akan meningkatkan limbah yang dihasilkan. Salah satu limbah dari tanaman padi adalah jerami padi. Limbah padi terdiri dari jerami 66,5%; sekam 24%; dan serbuk dedak 9,5% sehingga jerami padi adalah salah satu bagian dari tanaman padi yang memiliki proporsi paling banyak (Nappu, 2013). Berdasarkan data tersebut bisa diasumsikan jumlah limbah jerami padi tahun 2016 sebesar 50,19 juta ton.

Pemanfaatan tanaman padi untuk konsumsi pangan yaitu pada bulir padi sedangkan bagian batang dan daun belum maksimal yang sebagian besar hanya sebagai limbah. Menurut Yulianto dkk (2009), pada sebagian petani, jerami sering digunakan sebagai mulsa pada saat menanam palawija dan pakan ternak. Pemanfaatan lainnya dari jerami padi menurut Abraham *et al.* (2016), jerami padi secara tradisional digunakan sebagai pakan ternak, bahan untuk industri kertas, dan pupuk organik. Jerami juga dibiarkan tetap disawah untuk dibakar. Jadi, jerami padi sangat potensial untuk dimanfaatkan dan dijadikan produk dengan nilai tambah yang tinggi.

Salah satu komponen yang cukup tinggi dalam jerami padi adalah lignoselulosa yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber organik yang terbarukan. Menurut Sanchez (2009), komponen terbesar dari lignoselulosa adalah selulosa diikuti oleh hemiselulosa dan lignin. Selulosa dan hemiselulosa adalah makromolekul yang dibentuk oleh gula yang berbeda, sedangkan lignin adalah polimer aromatis yang disintesis dari prekursor *phenylpropanoid*. Menurut Howard *et al.* (2003), jerami padi mengandung 32,1% selulosa, 24% hemiselulosa, dan 18% lignin.

Fraksi lignin pada bahan-bahan seperti jerami, sekam, bagas serta limbah pertanian lainnya memiliki sejumlah komponen fenolik terutama *ferulic*, *p-coumaric*, *syringic*, *vanillic*, dan *p-hydroxybenzoic* (Martins *et al.*, 2011). Pemanfaatan senyawa-senyawa tersebut akan memberikan nilai tambah dari penggunaan lignin. Menurut Jung *et al.* (2015), nilai tambah utama dari penggunaan lignin dapat dikategorikan menjadi tiga kelompok: bahan bakar, makromolekul, dan senyawa aromatik. Berdasarkan penggunaan lignin tersebut, senyawa aromatik hasil turunan lignin seperti BTX (*benzene*, *toluene*, dan *xylene*), fenol, dan vanilin, diharapkan untuk menarik pasar potensial.

Produk hasil turunan lignin salah satunya vanilin dapat diperoleh melalui beberapa tahap seperti proses *pretreatment*, ekstraksi, dan pemurnian. Pada penelitian ini akan dilakukan proses *pretreatment* jerami padi secara biologis serta proses ekstraksi. Menurut Monrroy *et al.* (2011), proses *pretreatment* dilakukan untuk memecah struktur biomassa agar meningkatkan pencernaan biomassa. Efek proses *pretreatment* dijelaskan sebagai pemecahan matriks dinding sel meliputi ikatan antara karbohidrat dan lignin, depolimerasi dan kelarutan polimer hemiselulosa juga untuk mengubah derajat kristalisasi dari selulosa. Dalam *pretreatment* secara biologis, mikroorganisme penghancur kayu menyerang kayu secara alami, mendegradasi lignin dan holoselulosa agar mudah untuk tumbuh pada biomassa, memproduksi pemecahan kompleks lignin-holoselulosa.

Mikroorganisme untuk mendegradasi lignoselulosa salah satunya adalah jamur pelapuk coklat. Menurut Aguiar *et al.* (2013), jamur pelapuk coklat mendegradasi bahan lignoselulosa dengan modifikasi dinding sel tanaman melalui reaksi fenton yang menghasilkan hidroksil radikal. Jamur ini menyebabkan depolimerisasi selulosa dengan cepat selama fase awal degradasi kayu, menghasilkan residu lignin. Beberapa contoh jamur pelapuk coklat meliputi *Gloeophyllum trabeum*, *Meruliporia incrassate*, *Coniophora putema*, dan *Serpula lacrymans* (Hastrup *et al.*, 2012). Jamur pelapuk coklat seperti *Serpula lacrymans* memiliki oksidasi berbasis reaksi fenton yang menghasilkan hidroksil radikal untuk memodifikasi lignoselulosa.

Hidroksil radikal ini akan menyerang lignoselulosa secara acak dan mengacaukan struktur matriks melalui pembelahan internal dari ikatan selulosa dan memodifikasi lignin (Ma *et al.*, 2016).

Salah satu cara untuk mendapatkan hasil modifikasi lignin tersebut dapat dilakukan dengan ekstraksi. Ekstraksi senyawa fenolik seperti asam ferulat dan vanilin dari sisa pertanian sangat penting untuk mengembangkan nilai tambah produk dari produk samping yang terbarukan (Buranov dan Mazza, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Dong *et al.* (2014), bahan berupa tanaman *Vanilla planifolia* Andrews diteliti untuk mengetahui volume pelarut yang optimal dalam ekstraksi vanila. Volume pelarut yang tinggi akan meningkatkan kadar vanilin yang diperoleh dikarenakan transfer massa dan efisiensi ekstraksi meningkat. Hal ini disebabkan dinding sel menempel di atas pelarut yang disebabkan oleh pelarut yang mendidih sehingga pelarut tidak menyentuh zat terlarut. Faktor lainnya yang berperan dalam ekstraksi senyawa dalam suatu bahan adalah jenis pelarut salah satunya etanol. Menurut Molina *et al.* (2012), etanol digunakan sebagai pelarut organik untuk menghindari pelarut beracun seperti *methanol*, *acetone*, kloroform atau *hexane*, karena potensi penggunaan dari zat yang diekstrak akan digunakan oleh manusia. Selain itu, pH asam dibutuhkan untuk meningkatkan hidrolisis struktur polimer dan melepaskan metabolit berbentuk monomer, serta mudah larut dengan cara ini.

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, penelitian ini diperlukan dengan melakukan optimasi perbandingan pelarut etanol dan lama waktu ekstraksi hasil degradasi jerami padi menggunakan jamur pelapuk coklat *Serpula lacrymans* untuk mengetahui kadar vanilin optimal yang dihasilkan.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh volume pelarut etanol dan lama ekstraksi jerami padi hasil biodegradasi jamur *Serpula lacrymans* terhadap kadar vanilin yang diperoleh?

1.3. Tujuan Penelitian

Mendapatkan kondisi optimal dari pelarut etanol dan lama ekstraksi terhadap kadar vanilin dari ekstrak jerami padi hasil biodegradasi jamur *Serpula lacrymans*

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai sumber vanilin alami dari limbah jerami padi.
2. Memperoleh informasi pengaruh pelarut etanol dan lama ekstraksi terhadap kadar vanillin hasil biodegradasi jerami padi yang paling optimal.
3. Mengetahui kadar vanilin pada jerami padi hasil biodegradasi jamur *Serpula lacrymans*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Jerami Padi

Tanaman padi umumnya merujuk pada tanaman dari spesies *Oryza sativa* L. genus *oryza* L. masuk dalam keluarga *poaceae* (*gramineae*) diklasifikasikan dibawah suku *Oryzae*, subfamili *Oryzoideae*. Spesies dari tanaman padi yang banyak dikonsumsi manusia serta ditanam di Asia adalah *O. sativa* L. tanaman ini tinggi dengan daun hijau cerah, bulir panjang sampai pendek, kecil, dan mudah patah (Abraham, 2016). Padi juga merupakan salah satu komoditi penghasil beras dan menjadi sumber pangan utama di Indonesia. Produksi padi menurut data Kementerian Pertanian (2017), mengalami peningkatan hampir tiap tahun seperti pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Data tanaman padi berdasarkan beberapa indikator

| No. | Indikator | 2014 | 2015 | 2016 |
|-----|-----------------------|------------|------------|------------|
| 1 | Luas panen (Ha) | 12.666.347 | 13.029.237 | 13.985.927 |
| 2 | Produksi (Ton) | 67.102.361 | 71.766.496 | 75.486.229 |
| 3 | Produktivitas (Ku/Ha) | 52,98 | 55,08 | 53,97 |

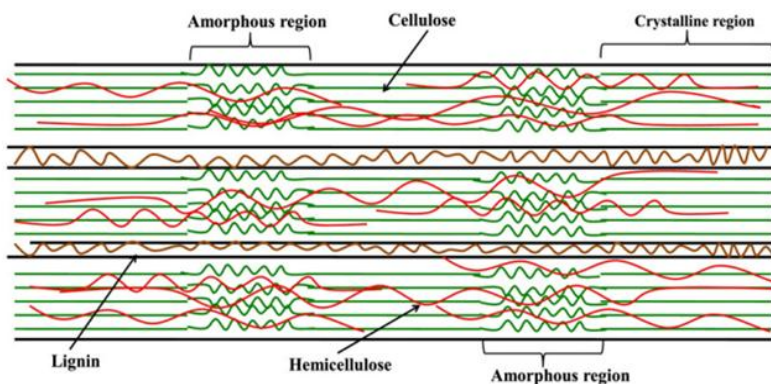
Peningkatan produksi padi akan mengakibatkan meningkatnya limbah jerami padi yang dihasilkan. Menurut Nappu (2013), limbah padi terdiri dari jerami 66,5%; sekam 24%; dan serbuk dedak 9,5% sehingga jerami padi diperkirakan berjumlah 50,19 juta ton pada tahun 2016. Limbah jerami padi yang cukup besar tersebut belum dimanfaatkan secara optimal. Pemanfaatan jerami padi diperkirakan sekitar 31-32% untuk pakan ternak, 36-38% untuk pupuk, 7-8% untuk bahan baku industri pulp dan kertas, sehingga diestimasikan sebesar 22-25% jerami padi masih belum bisa dimanfaatkan dengan optimal (Setiarto, 2013).

Jerami padi mengandung 32,1% selulosa, 24% hemiselulosa, dan 18% lignin (Howard *et al.*, 2003). Beberapa sumber menyebutkan jerami padi mengandung lignin sebesar 10% (khar, 2013) dan 5-24% (Mustafa *et al.*, 2016). Menurut

Linh *et al.* (2017), asam *hydroxycinnamic* seperti asam p-koumarik (4- asam *hydroxycinnamic*, PCA) dan asam ferulat (4-*hydroxy-3-methoxycinnamic*, FA) adalah senyawa yang memiliki nilai tambah yang tinggi. Senyawa-senyawa tersebut memiliki persentase yang tinggi pada tanaman rerumputan (contohnya sekitar 8,6 dan 8,7 mg/g jerami padi untuk PCA dan FA). Senyawa asam ferulat dapat digunakan sebagai bahan baku untuk pembuatan vanilin.

2.2. Lignoselulosa

Lignoselulosa adalah komponen utama biomassa, berisikan sekitar setengah bahan tanaman yang dihasilkan dari fotosintesis (juga disebut fotomassa) dan menunjukkan sumber organik terbarukan yang melimpah dalam tanah. Lignoselulosa terdiri dari tiga tipe polimer, selulosa, hemiselulosa dan lignin yang terhubung secara kuat dan terikat secara kimia dengan gaya non-kovalen dan ikatan silang kovalen (Sanchez, 2009). Menurut Chen *et al.* (2017), lignoselulosa utamanya mengandung 40-50% selulosa, 25-30% hemiselulosa, 15-20% lignin, dan sedikit pektin, senyawa nitrogen, serta komponen inorganik. Struktur lignoselulosa biomassa seperti pada **Gambar 2.1** menunjukkan posisi selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Struktur selulosa sendiri terdapat daerah amorf dan daerah kristalin.



Gambar 2.1 Struktur lignoselulosa biomassa dengan area amorf dan Kristal (Park *et al.*, 2010).

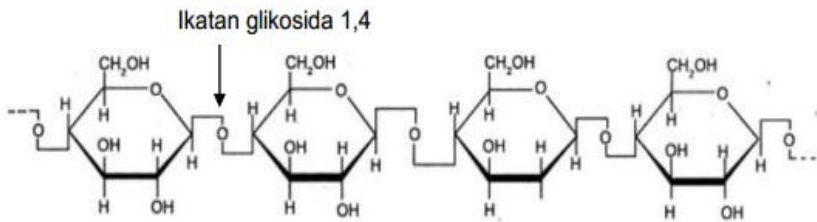
Biomassa lignoselulosa memberikan alternatif untuk bahan bakar fosil sebagai sumber karbon. Setiap tahun akumulasi biomassa lignoselulosa tidak hanya menyebabkan dampak buruk bagi lingkungan, namun menjadi bahan baku yang potensial untuk diproses menjadi produk bahan bakar berbasis bio, energi, dan bahan kimia dengan nilai tambah (Monrroy *et al.*, 2011). Menurut Howard *et al.* (2003), selulosa dan hemiselulosa merupakan polisakarida yang dapat dihidrolisis menjadi gula dan kemudian difermentasi menjadi etanol atau senyawa alifatik. Komponen lignin akan menghasilkan senyawa-senyawa aromatik yang berpotensi menjadi produk bernilai tambah tinggi seperti vanilin (*vanillin*) dan asam galat (*gallic acid*).

2.2.1. Selulosa

Selulosa adalah polimer linier yang terdiri dari subunit D-glukosa terikat oleh β -1,4 ikatan glikosidik membentuk selobiosa yang tampak pada **Gambar 2.2**. Ikatan ini membentuk rantai panjang (atau dasar fibril) terikat bersama oleh ikatan hidrogen dan gaya *van der waals* (Sanchez, 2009). Menurut Ravindran dan Jaiswal (2016), dinding sel tanaman tersusun atas mikrofibril yang terbentuk dari rantai selulosa terikat bersama ikatan hidrogen. Mikrofibril rantai panjang yang tidak larut air terdiri dari 36 ikatan glukosa terhubung dengan ikatan hidrogen dan setiap rantai mengandung sekitar 5000-14000 molekul glukosa. Ikatan ini dipecah dengan cara hidrolisis, yang dikatalis dengan selulase atau asam (Jung *et al.*, 2015).

Selulosa adalah polimer yang melimpah di bumi dan memiliki sifat-sifat bermanfaat seperti biokompatibilitas, stereoregularitas, hidrofilisitas, dan kelompok hidroksil reaktif. Polimer ini tidak larut dalam air kecuali pada suhu tinggi atau dengan adanya katalis tertentu (Chen *et al.*, 2017). Menurut Hastrup *et al.* (2012), rantai selulosa dalam kayu disusun dalam mikrofibril dengan daerah yang mengandung struktur kristal serta daerah selulosa yang kurang teratur. Perubahan kristalinitas kayu selama pembusukan jamur pelapuk coklat menunjukkan peningkatan awal dalam persentase kristal sebagai komponen kayu yang bersifat amorf, yaitu hemiselulosa dan selulosa non-

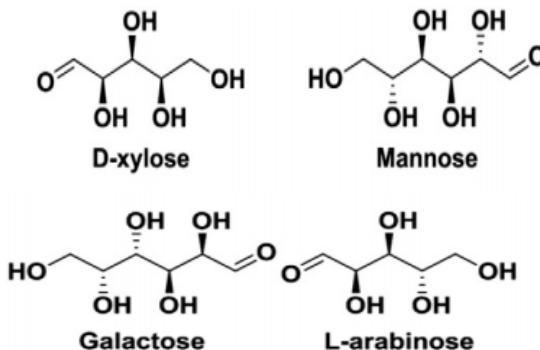
kristal dihilangkan. Hal ini diikuti oleh penurunan persen kristalinitas karena bahan selulosa mulai dipecah.



Gambar 2.2 Struktur molekul selulosa (Sumardjo, 2008).

2.2.2. Hemiselulosa

Hemiselulosa adalah polisakarida dengan berat molekul lebih rendah dibanding selulosa. Hemiselulosa terbentuk dari D-xylosa, D-manosa, D-galaktosa, D-glukosa, L-arabinosa, 4-O-methyl-glucuronic, D-galacturonic, dan D-asam glukuronik yang tampak pada **Gambar 2.3**. Gula-gula ini terikat bersama dengan β -1,4- dan biasanya oleh β -1,3 ikatan glikosidik (Sanchez, 2009). Menurut Jung *et al.* (2015), hemiselulosa mengandung cabang rantai pendek monosakarida seperti pentose (xilosa, rhamnosa, dan arabinosa), hexose (glukosa, manosa, dan galaktosa), dan asam uronik.

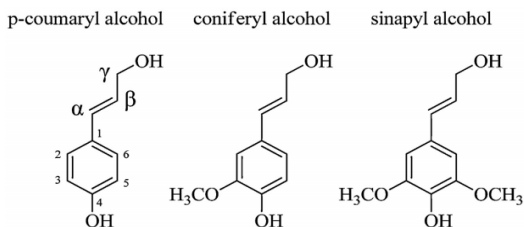


Gambar 2.3 Unit-unit penyusun hemiselulosa (Chen *et al.*, 2017).

Hemiselulosa pada tanaman *softwood* berupa *O-acetyl-galacto-glucomannans* dan *arabino-4-O-methylglucorono-D-xylans* sedangkan pada tanaman *hardwood* berupa *O-acetyl-4-O-methylglucorono-D-xylans*. Tanaman tahunan memiliki hemiselulosa utama yaitu *arabino-(O-acetyl-4-O-methylglucorono)-D-xylans* yang juga memiliki *p-coumaric* dan asam ferulat yang terikat pada arabinose, hidrolisis hemiselulosa mengacu pada formasi pentose (kebanyakan pada *hardwood* dan tanaman tahunan) , heksosa (terutama pada *softwood*), dan asam uronik (Jonsson dan Martin, 2016). Menurut Sun *et al.* (2014) asam uronik seperti asam α -D-glukoronik, α -D-4-O-metilglukoronik dan α -D-galaktoglukoronik juga ditemukan di dalam hemiselulosa gula lainnya seperti α -L-ramnosa dan α -L-fukosa juga ditemukan dalam jumlah kecil. Hemiselulosa terikat pada selulosa oleh ikatan hidrogen dan terikat dengan lignin oleh ikatan kovalen.

2.2.3. Lignin

Lignin adalah biopolimer tiga dimensi bersifat amorf yang merupakan salah satu komponen lignoselulosa biomassa. Volarisasi efisien dari lignin sangat penting karena biomassa sebagai bahan baku terbarukan untuk bahan bakar dan bahan kimia. Namun, struktur dari lignin yang kompleks, karena lignin adalah polimer dari tiga komponen dasar yaitu *p-coumaryl*, *coniferyl*, dan *sinapyl alcohol*, terhubung melalui ikatan yang berbeda seperti pada **Gambar 2.4**. Sebagai contoh, struktur dari lignin pada *hardwood* dan *softwood* didominasi oleh ikatan α - dan β -*aryl ether* (Guenatam *et al.*, 2015). Lignin adalah heteropolimer aromatis alami yang menjadi salah satu penyusun lignoselulosa dalam biomassa yang memberikan struktur kompak pada dinding sel tanaman (Asina *et al.*, 2016).



Gambar 2.4 Komponen dasar pembentuk lignin (Laurichesse dan Avérous, 2014).

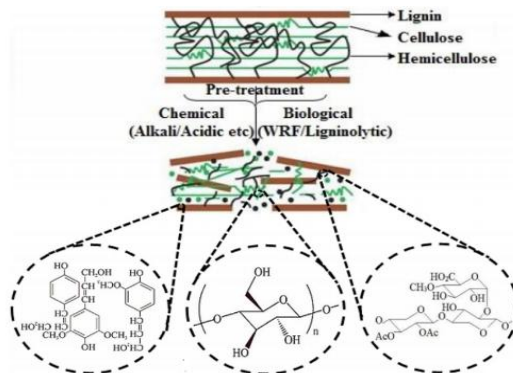
Potensi terbesar lignin berdasarkan kemungkinannya untuk digunakan dalam banyak aplikasi. Fraksinasi struktur lignin menjadi molekul yang kecil, menggunakan teknik yang canggih seperti pirolisis, hidrogenasi adalah kebutuhan untuk produksi senyawa kimia, energi dan bahan bakar. Depolimerasi lignin berdasarkan dekomposisi termokimia dapat menjadi senyawa dengan berat molekul rendah seperti vanilin, senyawa aromatis hidroksilat, aldehid, asam alifatik, dan banyak lainnya (Rodriguez *et al.*, 2017). Sebagai tambahan, senyawa fenol total (total phenolic compounds/TPC), diturunkan dari lignin yang meliputi asam p-kumarik, asam ferulat, *syringaldehyde*, dan vanilin (Kundu *et al.*, 2016). Menurut Zhuang *et al* (2016), vanilin, asam vanilik, *p-hydroxybenzaldehyde* dan asam *p-hydroxybenzoic* adalah produk dekomposisi oksidatif yang lebih jauh dari asam ferulat dan asam kumarik.

2.2.4. *Pretreatment* Lignoselulosa Secara Biologi

Proses *pretreatment* dilakukan untuk memecah struktur biomassa, ini dibutuhkan untuk meningkatkan digestabilitas biomassa. Efek dari *pretreatment* telah dideskripsikan sebagai pemecahan matriks dinding sel meliputi hubungan antara karbohidrat dan lignin, depolimerasi dan melarutkan polimer hemiselulosa, juga sebagai perubahan derajat kristalinitas selulosa (Monrroy, 2011). Dekomposisi lignoselulosa biomassa yang tampak pada **Gambar 2.5** dapat dilakukan dengan metode *pretreatment* yang berbeda seperti fisik (pengecilan ukuran), panas (aplikasi suhu dan tekanan tinggi), kimia (aplikasi asam kuat), dan biologis (aplikasi mikroorganisme untuk dekomposisi

lignoselulosa) telah dilakukan beberapa tahun terakhir. *Pretreatment* biologis lebih aman secara lingkungan dibandingkan dengan metode lainnya karena pretreatment biologis lebih sedikit konsumsi energi dan bahan kimia. (Mustafa *et al.*, 2016).

Metode *pretreatment* biologis menggunakan mikroorganisme untuk mendegradasi lignin secara selektif dan membuat biomassa lebih mudah diakses untuk pembusukan (Arantes *et al.*, 2012). Proses *pretreatment* ini menggunakan mikroorganisme seperti jamur pelapuk coklat, putih, dan lunak untuk mendegradasi lignin dan hemiselulosa dari lignoselulosa biomassa. Parameter penting dalam proses *pretreatment* biologis meliputi komposisi biomassa dan parameter lainnya seperti tipe mikroorganisme yang terlibat, suhu inkubasi, waktu inkubasi, konsentrasi inokulum, kadar air, dan tingkat aerasi (Sindhu *et al.*, 2016).



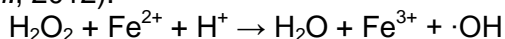
Gambar 2.5 Proses *pretreatment* lignoselulosa (Gallegos *et al.*, 2017).

2.2.5. *Serpula lacrymans*

Jamur pelapuk coklat salah satunya *Serpula lacrymans* adalah kelompok basidiomikota yang memiliki siklus hidup berawal dari miselium monokariotik. Miselium tersebut dapat membentuk untaian tebal untuk mengangkut nutrisi dan air dan dapat tumbuh beberapa meter melewati material inorganik. Kondisi yang cocok untuk pertumbuhan miselium ini pada

derajat kelembaban yang tinggi, aliran udara rendah, dan suhu dibawah 25°C, kondisi inilah yang menyebabkan *Serpula lacrymans* biasanya ditemukan pada daerah dingin (Jennings dan Bravery, 1991). Menurut Eriksson *et al.* (1990), *Serpula lacrymans* mendepolimerasi komponen lignin dari kayu untuk mengakses selulosa. Selulosa kemudian akan didekomposisi dan digunakan secara efisien. Hasil jamur pelapuk coklat (sisa lignin) menyumbang sekitar 0% dari karbon di dalam tanah dan berfungsi sebagai cadangan karbon di daerah dingin.

Proses pelapukan oleh jamur *Serpula lacrymans* melibatkan penyerangan ke dinding sel tanaman dengan menghasilkan hidroksil radikal secara ekstraseluler melalui reaksi fenton. Keterlibatan reaksi fenton lebih jauh dikarenakan *Serpula lacrymans* memproduksi fenolat besi (Eastwood *et al.*, 2011). Fenolat ini dapat menghasilkan besi yang dibutuhkan untuk memproduksi hidroksil radikal dalam reaksi fenton. (Kausrud *et al.*, 2012):

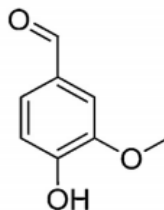


Penelitian oleh Hastrup *et al.* (2006), menggunakan dua belas *strain* jamur *Serpula lacrymans* untuk mengetahui tingkat tumbuh, kemampuan melapukkan kayu dan akumulasi asam oksalat pada kayu pinus. Kemampuan melapukkan kayu dilihat pada berat yang hilang pada kayu. Perlakuan berupa penambahan kalsium berupa CaCl_2 dan tembaga sitrat menunjukkan berat yang hilang sangat sedikit dibandingkan dengan hanya penambahan tembaga sitrat. Pada kayu yang hanya ditambah CaCl_2 juga menunjukkan berat yang hilang tidak signifikan terhadap kontrol. Tingkat tumbuh jamur tidak cukup dihambat dengan perlakuan konsentrasi 0,1% dari tembaga sitrat dan CaCl_2 , hal ini disebabkan jamur *Serpula lacrymans* diketahui dapat bertahan dengan keberadaan tembaga. Akumulasi asam oksalat diukur menggunakan HPLC menunjukkan jumlah asam oksalat paling tinggi dengan adanya tembaga sitrat sedangkan kontrol memiliki jumlah asam oksalat paling rendah.

2.3. Vanilin

Vanilin (4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde) adalah salah satu pemberi rasa dan aroma yang paling populer yang berasal dari jalur *phenylpropanoid*. Metabolit ini disintesis dari kulit spesies vanilla, terutama spesies *Vanilla planifolia* (Bastide et al., 2014). Vanilin adalah fenol aldehid dengan tiga grup fungsional yang berbeda dari aldehid, hidroksil, dan eter (Kayalvizhi dan Pandurangan, 2017). Menurut Shakeel *et al.* (2015), vanilin seperti pada **Gambar 2.6** berbentuk jarum kristal dengan warna putih sedikit kuning, memiliki rumus molekul $C_8H_8O_3$ dan berat molar 152,15 g/mol. Kegunaan vanilin sangat beragam mulai sebagai agen flavor makanan dan minuman, sebagai antioksidan yang tinggi karena adanya kelompok fenol sampai digunakan di industri farmasi.

Produksi vanilin berasal langsung dari ekstraksi biji vanilla. Namun, untuk memuaskan peningkatan pasar, jalur kimia baru telah dikembangkan. Sekarang, vanilin diproduksi dari guaiacol dengan jumlah sekitar 85% dari pemasok dunia, sisanya sekitar 15% diproduksi dari lignin (Araujo *et al.*, 2010). Vanilin dapat diperoleh dari sumber lain seperti asam ferulat. Menurut Kumar (2014) biosintesis vanillin dari asam ferulat didapatkan dengan konversi asam ferulat menjadi *feruloyl* SCoA (*feruloyl* koenzim A dihilangkan) menggunakan ATP (*adenosine triphosphate*) dan CoASH (koenzim A dihilangkan). Penghilangan molekul air dan $CH_3COSCoA$ mengubah *feruloyl* SCoA menjadi vanilin.



vanillin

Gambar 2.6 Struktur molekul vanilin (Laurichesse dan Avérous, 2014).

Penelitian tentang vanilin yang dilakukan oleh Harshvardhan *et al.* (2017) menggunakan bahan lignoselulosa berupa potongan bambu sebagai bahan baku untuk produksi vanilin. Proses tersebut memanfaatkan 14 konsorsium bakteri yang telah diisolasi. Bakteri tersebut digunakan sebagai agen biokonversi lignin menjadi vanilin dalam kondisi labu kocok. Hasilnya berupa larutan yang akan diekstraksi dengan etil asetat dan dikeringkan dengan evaporator. Penentuan vanilin menggunakan analisis HPLC. Produksi vanilin yang diperoleh sekitar $0,9 \pm 0,03$ mg/mL. Senyawa lainnya yang terdeteksi berupa *p-hydroxy benzaldehyde*, asam ferulat, dan *sinapyl alcohol* dalam konsentrasi yang berbeda.

2.4. Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode yang digunakan untuk memperoleh komponen dari campuran padatan atau cairan. Secara umum, ekstraksi terdiri dari dua tahap: pertama, bahan yang akan diekstraksi direndam di dalam pelarut agar mengembang dan menyeimbangkan cairan di dalam bahan. Kedua, komponen yang larut air berpindah ke dalam pelarut dengan transfer massa dari difusi dan penyerapan (Oliveira *et al.*, 2015). Ekstraksi adalah proses awal dan juga menjadi langkah dasar dalam mendapatkan dan memurnikan senyawa fenol dari tanaman. Efisiensi dari ekstraksi bergantung pada beberapa parameter seperti suhu, waktu, polaritas pelarut dan pH, serta parameter tersebut dapat bekerja sendiri ataupun saling mempengaruhi (Bae *et al.*, 2015).

Salah satu metode ekstraksi yang banyak dilakukan adalah metode maserasi. Ekstraksi maserasi adalah metode konvensional yang dengan mudah diterapkan menjadi skala industri dan secara tradisional digunakan di dalam ekstraksi senyawa bioaktif. Manfaat utama metode ini adalah kemudahan, namun jika variabel tidak dioptimasi akan membutuhkan periode waktu yang lama, suhu yang tinggi menghasilkan biaya energi yang tinggi dan penurunan senyawa bioaktif (Roriz *et al.*, 2017). Untuk meningkatkan *yield* dan mempercepat proses ekstraksi, hal yang dilakukan adalah meningkatkan suhu dari sistem dan/atau meningkatkan agitasi untuk menurunkan konsentrasi di

lingkungan dekat matriks, memungkinkan untuk tetap memiliki gradien ekstraksi yang menguntungkan (Gallo *et al.*, 2017).

2.5. Response Surface Method

Response surface method (RSM) adalah metode statistik yang menggunakan data kuantitatif dari desain eksperimen yang sesuai untuk menentukan atau menyelesaikan persamaan multivariat secara bersama. RSM dapat menghasilkan model matematis dan mempertimbangkan kemungkinan keterkaitan antar variabel uji dengan meminimalkan jumlah eksperimen (Dahmoune *et al.* 2014). *Central composite design* (CCD), *box-behnken* (BBD) dan *d-optimal* adalah tiga metode dasar untuk menghasilkan desain permukaan respon standar. Secara umum, RSM terdiri dari tiga tahap, desain eksperimen, model permukaan respon dan optimasi (Seifollahi *et al.*, 2017).

Penelitian dilakukan oleh Faveri *et al.* (2007), vanilin diproduksi menggunakan biomassa dan asam ferulat dengan bantuan bakteri *Escherichia coli* JM109Pbb1. Peneliti akan mengoptimalkan perlakuan konsentrasi biomassa (X_0) sebesar 250-500 mg L⁻¹ dan konsentrasi asam ferulat (S_0) sebesar 1-5 mM dalam produksi tipe *batch*. Perlakuan paling optimal yaitu konsentrasi biomassa sebesar 380 mg L⁻¹ dan konsentrasi asam ferulat sebesar 2,95 mM. Kondisi tersebut menghasilkan respon berupa konsentrasi vanilin maksimal (P_v) sebesar 1,45 mM, *yield* vanilin pada asam ferulat yang dikonsumsi (Y_v) sebesar 0,57 mM mM⁻¹, *vanillyl alcohol* pada asam ferulat yang dikonsumsi (Y_{al}) sebesar 0,39 mM mM⁻¹, produktivitas vanilin volumetrik (Q_v) sebesar 0,124 mM h⁻¹, dan produktivitas vanilin spesifik (q_v) sebesar 0.047 g g⁻¹ h⁻¹.

2.6. Penelitian Terdahulu

2.6.1. Pelarut Etanol

Penelitian oleh Shakeel *et al.* (2015), menggunakan vanilin murni yang diekstraksi dengan beberapa pelarut. Metode ekstraksi menggunakan maserasi dengan alat *water bath shaker* pada suhu 298-318 K selama 72 jam dengan kecepatan 100 rpm. Hasilnya berupa Kristal vanilin yang larut dalam etanol sebesar $7,94 \times 10^{-2}$ lebih tinggi dari pada air, butanol, dan

propanol. Hal tersebut menunjukkan bahwa pelarut etanol cukup baik dalam melarutkan vanilin dan diperlukan optimasi untuk mengetahui volume yang paling optimal dalam melarutkan vanilin.

Penelitian oleh Dey dan Kuhad (2014) menggunakan gandum yang difermetasi dengan *Rhizopus oryzae* RCK2012. Hasil fermentasi tersebut akan diekstraksi dengan kondisi operasi yang berbeda. Tujuan ekstraksi ini adalah mendapatkan senyawa fenol yang sangat bermanfaat sebagai sumber antioksidan. Kondisi operasi yang dilakukan berupa komposisi pelarut, suhu, waktu, dan rasio bahan dengan pelarut. Pelarut etanol 70% dan rasio bahan dengan pelarut 1:15 menghasilkan *total phenolic compound* (TPC) sekitar 7 mg GAE g⁻¹ grain dan terus meningkat seiring meningkatnya volume pelarut yaitu pada rasio 1:20 sekitar 7,5 mg GAE g⁻¹ grain. Maka, penelitian yang akan dilakukan menggunakan rasio jerami padi dengan pelarut yaitu 1:2, 1:4, dan 1:6 sehingga jerami padi seberat 10 gram diekstraksi dengan volume pelarut yang berbeda yaitu 20 ml, 40 ml, dan 60 ml. Pemilihan volume pelarut tersebut berdasarkan jurnal yang mana pada rasio 1:20, TPC yang dihasilkan masih mengalami peningkatan serta penyesuaian dengan bahan yang digunakan.

2.6.2. Lama Ekstraksi

Penelitian oleh Dong *et al.* (2014), bahan berupa tanaman *Vanilla planifolia* Andrews diekstraksi menggunakan empat macam metode yaitu *ultrasound-assisted extraction* (UAE), *pressure-assisted extraction* (PAE), *microwave-assisted extraction* (MAE), dan maserasi. Metode maserasi menggunakan pelarut larutan etanol-air 70% (v/v) pada suhu 25°C selama waktu yang bervariasi yaitu 120 menit sampai 720 menit. Hasilnya diperoleh bahwa *yield* vanilin menggunakan metode MAE sebesar 1,68% dalam 12 menit, metode maserasi sebesar 1,62% dalam 600 menit, metode UAE sebesar 1,55% dalam 60 menit, dan metode PAE sebesar 1,55% dalam 90 menit. Dalam penelitian tersebut belum diperoleh perlakuan mana yang menghasilkan *yield* vanilin paling optimal. Maka penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui perlakuan

paling optimal untuk mendapatkan kadar vanilin dengan metode maserasi.

Penelitian oleh Martin dan Khosrowshahi (2017) menggunakan limbah *pomegranate* industri yang diekstrak untuk mendapatkan senyawa fenol. Kondisi operasi ekstraksi yang berbeda akan dioptimalkan menggunakan metode RSM. Variabel yang digunakan adalah konsentrasi etanol, rasio pelarut dengan bahan, suhu, dan waktu. Respon berupa *total phenolic content* (TPC), *hydrolysable tannins* (HT), *total flavonoids* (TF), *radical scavenging activity* (dinilai sebagai DPPH%) dan *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Respon TPC diperoleh kondisi operasi optimal berupa konsentrasi etanol 60%, rasio pelarut dengan bahan 30ml/g, suhu 40°C, dan waktu 6 jam. Penelitian tersebut juga menggunakan waktu ekstraksi selama 2 jam dan 4 jam namun hasil TPC tidak optimal. Jadi pada penelitian yang akan dilakukan menggunakan waktu ekstraksi yaitu 2 jam, 4 jam, dan 6 jam yang diterapkan pada ekstraksi jerami padi berdasarkan jurnal tersebut.

2.7. Hipotesa

Diduga kondisi optimal ekstraksi vanilin hasil biodegradasi jerami padi dapat diperoleh dari interaksi faktor volume pelarut etanol dan lama ekstraksi.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Penelitian ini dimulai dari tanggal 10 Januari 2017 sampai 30 Juli 2017.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Timbangan digital tipe GE2102 (Sartorius, Jerman), timbangan analitik tipe ABJ 220-4 (Kern, Jerman), desikator, *Erlenmeyer*, *petridish disposable*, *laminar air flow*, gelas ukur, *waterbath shaker* tipe SW 22 (*Julabo*, Jerman), pH-meter tipe ST20 (Ohaus, Jerman), corong, kain saring, kertas saring, baskom, panci, spatula, sarung tangan, parafilm, masker, inoolop, bunsen, termometer, inkubator tipe VS 1203P3L (Vision, Jepang), botol kaca diameter 8 cm, gelas *beaker*, *tissue*, *aluminium foil*, plastik, *centrifuge tube*, pinset, tip mikro, cawan petri *disposhable* diameter 9 cm dan 5 cm, botol semprot, kuvet *disposhable* 1,5 ml, *blue tip* 1 ml, *blue tip* 0,1 ml, spektrofotometer UV-Vis tipe Genesys 10 UV (Thermo Scientific, Amerika Serikat), kompor tipe 522C 2 tungku (Rinnai, Indonesia), saringan besi, gunting, tempat tabung reaksi dari aluminium, kuvet, *autoclave* tipe HVE-50 (Hirayama, Jepang), tip mikro, mikropipet 100-1000 μ l tipe VA-600 (Accumax, India), mikropipet 50-200 μ l tipe VA-600 (Accumax, India), oven listrik (Mermmert, Jerman), *rotary vacuum evaporator* tipe RV 10 (IKA, Malaysia), dan LC-MS/MS (TSQ Quantum dari Thermo Scientific, Amerika Serikat).

3.2.2 Bahan

Jerami padi diperoleh dari kecamatan Lowokwaru Kota Malang. Jerami padi tersebut diambil dalam kondisi basah kemudian dikeringkan menggunakan sinar matahari selama 7 hari. Bahan-bahan lainnya berupa *malt extract agar*, *agar*

bacteriological, barley, 3,5 DNS (*Dinitrosalysilic acid*), *gypsum* CaSO_4 , CaCO_3 , alkohol 70%, spirtus, isolat jamur *Serpula lacrymans*, aquades, dan etanol (pro-analitis).

3.3 Rancangan Penelitian

Metode optimasi berupa *Response Surface Method* (RSM) digunakan untuk mengetahui volume etanol dan lama waktu ekstraksi yang optimal. Faktor (variabel bebas) yaitu volume etanol X_1 (ml) dan lama waktu ekstraksi X_2 (menit) dengan variabel respon yaitu kadar vanilin. Taraf kedua faktor dapat dilihat pada **Tabel 3.1** dan rancangan penelitian pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3.1 Taraf level faktor

| Faktor | Taraf Level | | |
|------------------------|-------------|-----|-----|
| | -1 | 0 | 1 |
| Volume etanol (ml) | 20 | 40 | 60 |
| Lama ekstraksi (menit) | 120 | 240 | 360 |

Berdasarkan **Tabel 3.1** dapat diketahui jarak antara level yaitu:

- Jarak antar level faktor volume etanol = $40 - 20 = 20$
- Jarak antar level faktor lama ekstraksi = $240 - 120 = 120$

Menetapkan level-level faktor yang sesuai dengan titik pusat $X_1=0$ dan $X_2=0$. Faktor volume etanol, hubungan antara variabel X_1 dengan variabel asli dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$X_1 = \frac{A - 40}{20}, A = 20 X_1 + 40 \dots \dots \dots \text{(I)}$$

Faktor lama ekstraksi, hubungan variabel-variabel X_2 dengan variabel asli dapat diketahui dengan cara yang sama sehingga dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$X_2 = \frac{B - 240}{120}, B = 120 X_2 + 240 \dots \dots \dots \text{(II)}$$

Menentukan nilai $\alpha = 2^{\frac{k}{4}}$, karena penelitian ini menggunakan dua faktor maka nilai $k=2$, sehingga $\alpha = 2^{\frac{2}{4}} = 1,414$. Setelah itu menentukan level-level faktor yang sesuai dengan nilai $-\alpha = -1,414$ dan $\alpha = 1,414$ dengan perhitungan melalui hubungan

variabel X_1 dan X_2 dengan variabel asli dalam persamaan (I) dan (II).

Dari persamaan (I) diketahui bahwa:

- $X_1 = -1,414$, sehingga $A = 20 (-1,414) + 40 = 11,72$ ml
- $X_1 = 1,414$, sehingga $A = 20 (1,414) + 40 = 68,28$ ml

Dari persamaan (II) diketahui bahwa:

- $X_2 = -1,414$, sehingga $B = 120 (-1,414) + 240 = 70,32$ menit
- $X_2 = 1,414$, sehingga $B = 120 (1,414) + 240 = 409,68$ menit

Tabel 3.2. Rancangan penelitian menggunakan *Response Surface Method*

| No | Variabel Kode | | Variabel Asli | | Respon | |
|-----|---------------|--------|--------------------|------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| | X_1 | X_2 | Volume etanol (ml) | Lama ekstraksi (menit) | Kadar vanilin (%) | Yield vanilin ($\mu\text{g/g}$) |
| 1. | -1 | -1 | 20 | 120 | Y_1 | Y_2 |
| 2. | 1 | -1 | 60 | 120 | Y_1 | Y_2 |
| 3. | -1 | 1 | 20 | 360 | Y_1 | Y_2 |
| 4. | 1 | 1 | 60 | 360 | Y_1 | Y_2 |
| 5. | -1,414 | 0 | 11,72 | 240 | Y_1 | Y_2 |
| 6. | 1,414 | 0 | 68,28 | 240 | Y_1 | Y_2 |
| 7. | 0 | -1,414 | 40 | 70,32 | Y_1 | Y_2 |
| 8. | 0 | 1,414 | 40 | 409,68 | Y_1 | Y_2 |
| 9. | 0 | 0 | 40 | 240 | Y_1 | Y_2 |
| 10. | 0 | 0 | 40 | 240 | Y_1 | Y_2 |
| 11. | 0 | 0 | 40 | 240 | Y_1 | Y_2 |
| 12. | 0 | 0 | 40 | 240 | Y_1 | Y_2 |
| 13. | 0 | 0 | 40 | 240 | Y_1 | Y_2 |

Berdasarkan rancangan percobaan yang diperoleh, maka didapatkan titik komposit terpusat pada **Tabel 3.3.**

Tabel 3.3 Titik komposit terpusat yang dicobakan

| Faktor | $-\alpha$ | -1 | 0 | 1 | $+\alpha$ |
|------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----------|
| Volume etanol (ml) | 11,72 | 20 | 40 | 60 | 68,28 |
| Lama ekstraksi (menit) | 70,32 | 120 | 240 | 360 | 409,68 |

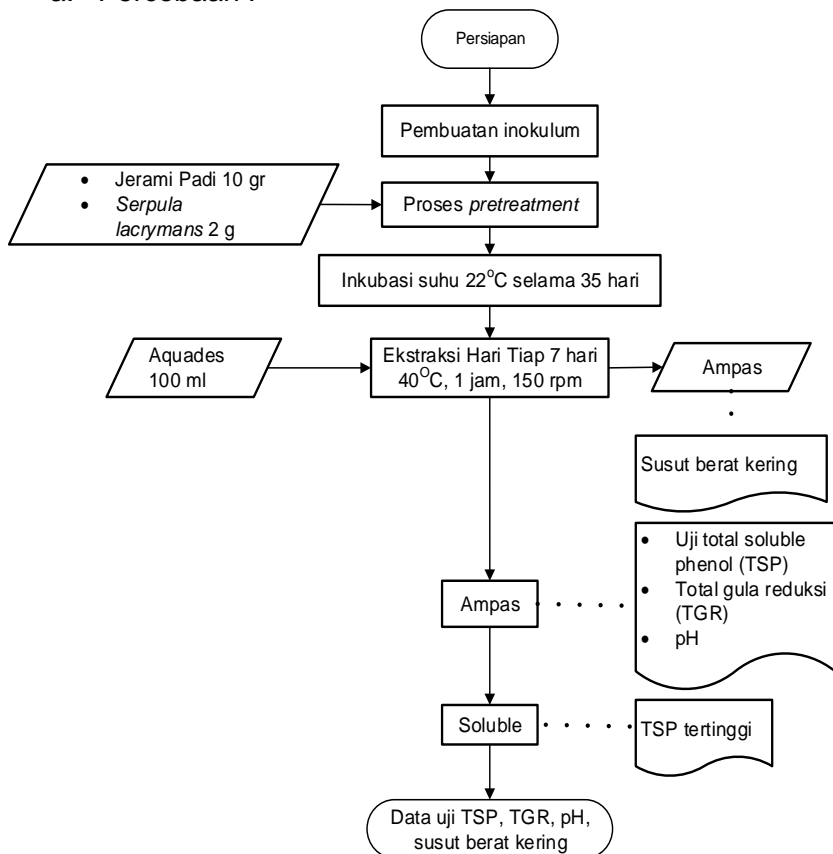
3.4 Batasan Masalah

1. Penelitian skala laboratorium
2. Pengaturan suhu ruangan dan inkubasi $22 \pm 2^\circ\text{C}$
3. Inokulan *grain spawn* $2 \pm 0,2$ gr

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan beberapa tahapan seperti pembuatan inoculum, inokulasi, inkubasi, ekstraksi sampai identifikasi vanilin yang dapat dilihat pada **Gambar 3.1 (a)** dan **Gambar 3.1 (b)**.

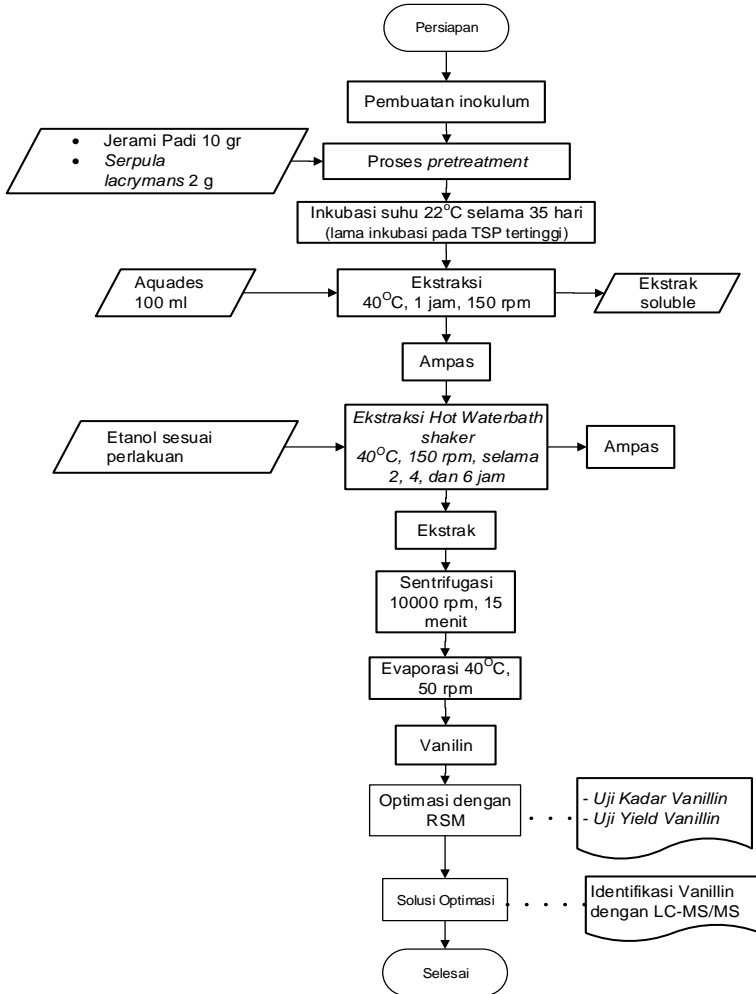
a. Percobaan I



Gambar 3.1 (a) Diagram alir penelitian percobaan I

b. Percobaan II

Lama inkubasi yang menghasilkan nilai TSP tertinggi digunakan pada tahap selanjutnya. Tahap ini akan menguji kadar vanilin dan yield vanilin yang diduga masih didalam ampas. Tahap ini dilakukan dua kali ekstraksi yaitu ekstraksi menggunakan pelarut aquades dan pelarut etanol.



Gambar 3.1 (b) Tahapan penelitian percobaan II

3.5.1 Preparasi Bahan dan Mikroorganisme

Pada tahap ini terdiri dari beberapa kegiatan yaitu pemotongan jerami padi agar seragam, pembuatan media *Malt Extract Agar* (MEA), inokulasi jamur *Serpula lacrymans* ke media MEA dan *barley*. Jerami padi yang telah dikumpulkan dipotong dengan ukuran sekitar 2-3 cm. Media MEA yang telah dibuat distelirasi kemudian ditempatkan ke dalam cawan petri *disposhable*. Inokulasi jamur *Serpula lacrymans* ke media MEA dilakukan di dalam *laminar air flow* agar tetap steril. Media MEA yang telah diinokulasi selanjutnya diinkubasi pada suhu 22 ± 2 °C. *Barley* yang telah disiapkan dimasukkan botol kaca kemudian disterilisasi. *Barley* yang telah siap diinokulasi dari kultur di media MEA. Tujuan penumbuhan ke *barley* adalah untuk agar memudahkan dalam penimbangan berat inokulum yang ditambahkan pada substrat jerami padi.

A. Pembuatan Media *Malt Extract Agar* (MEA)

Langkah pertama *malt extract* dan *agar bacteriological* ditimbang masing-masing seberat 20 gram dan 12 gram. *Malt extract* dan *agar bacteriological* dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* dan ditambah 1 L aquades kemudian diaduk secara merata menggunakan spatula. *Erlenmeyer* ditutup menggunakan kapas, kertas coklat dan dibungkus menggunakan kantong plastik untuk menghalangi uap air masuk saat sterilisasi. Sterilisasi media MEA menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah selesai, media MEA didiamkan hingga suhu 40 ± 5 °C. Media MEA yang telah hangat dituangkan ke cawan petri sampai setengahnya di dalam *laminar air flow* (LAF). Kemudian didiamkan hingga padat dan dirapatkan menggunakan parafilm agar tidak mudah lepas.

B. Inokulasi *Serpula lacrymans* pada Media *Malt Extract Agar* (MEA)

Inokulasi jamur pada media *Malt Extract Agar* (MEA) dilakukan di dalam *laminar air flow* agar tetap steril. *Laminair Air Flow* (LAF) disterilkan terlebih dahulu dengan cara dibersihkan menggunakan alkohol. Inokulasi dilakukan dengan

memindahkan isolat *Serpula lacrymans* sebanyak dua ose pada media MEA yang telah padat. Pemindahan *S. lacrymans* menggunakan *inoloop* ke dalam MEA. Media MEA ditutup dan dirapatkan menggunakan parafilm. Kemudian diinkubasi pada suhu 22 ± 2 °C. Selama inkubasi diamati pertumbuhannya, jika terkontaminasi maka dilakukan pengulangan inokulasi.

C. Pembuatan Media Grain Spawn

Media *barley* ditimbang sebesar 1 kg *barley* kemudian dicuci dengan air mengalir sebanyak 2 kali. Selanjutnya *barley* dimasukkan ke dalam panci dan ditambahkan aquades sebanyak 1 Liter. *Barley* dimasak dengan api kecil sambil terus diaduk selama 7 ± 3 menit. Setelah *barley* sedikit lunak, ditiriskan atau disaring untuk memisahkan air yang masih ada. *Barley* yang telah masak dipindahkan ke dalam baskom dan ditambahkan CaSO_4 sebanyak 10 mg dan CaCO_3 sebanyak 3 mg. *Barley* didiamkan sampai suhu 40 ± 5 °C. Selanjutnya dipindahkan ke dalam botol kaca dengan berat seragam (satu botol berisi 100 gram). Botol yang diisi dengan *barley* ditutup tidak terlalu rapat untuk tujuan sterilisasi. Sterilisasi dilakukan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah selesai *barley* didiamkan semalam atau 24 jam untuk menghindari kontaminasi. Selanjutnya *barley* disterilisasi kembali dengan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah itu didiamkan sampai suhu 40 ± 5 °C dan *barley* siap diinokulasi.

D. Inokulasi pada Grain Spawn

Inokulasi pada *barley* menggunakan isolat yang telah ditumbuhkan pada media mea . Isolat *Serpula lacrymans* dipindahkan pada media *barley* sebanyak 3-4 ose. Botol berisi *barley* ditutup dan dirapatkan kembali dengan parafilm. Kemudian diinkubasi pada suhu 22 ± 2 °C. Selama inkubasi diamati pertumbuhannya, jika terkontaminasi maka dilakukan pengulangan inokulasi.

3.5.2 Pretreatment Jerami Padi

Jerami padi yang telah dipotong dengan ukuran sekitar 2-3 cm ditempatkan di dalam botol kaca sebanyak 10 gram. Setiap botol ditambahkan aquades sebanyak 10 ml. Botol-botol tersebut disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 20 menit. Botol yang telah disterilisasi didiamkan satu malam (24 jam) untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Botol-botol tersebut disterilisasi kembali pada suhu, tekanan dan waktu yang sama dengan sebelumnya. Setelah selesai botol didinginkan sampai suhu sekitar 40 ± 5 °C. Kemudian *Serpula lacrymans* yang telah tumbuh pada *barley* diinokulasikan sebanyak 2 gram ke masing-masing botol. Selanjutnya diinkubasi selama 35 hari pada suhu 22 ± 2 °C. Diamati setiap 7 hari dengan melakukan *Total Soluble Phenol* (TSP), pengukuran pH serta susut berat.

3.5.3 Ekstraksi Jerami Padi

Ekstraksi dilakukan setiap 7 hari untuk ditentukan kadar TSP, susut berat kering, dan pH. Penentuan kadar vanilin dilakukan dengan ekstraksi jerami padi yang telah diinkubasi dengan lama waktu yang paling optimal. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut air dan etanol.

A. Ekstraksi Pelarut Air

Jerami padi diekstraksi menggunakan pelarut air setiap 7 hari. Pelarut berupa aquades dipanaskan sampai suhu 80 °C kemudian ditambahkan kedalam masing-masing botol 100 ml. Hal ini bertujuan untuk membantu melarutkan gula reduksi yang terkandung di dalam bahan. Eksktraksi menggunakan *water bath shaker* pada suhu 40 °C, selama 1 jam dan kecepatan 150 rpm. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kain saring dan kertas saring yang akan menghasilkan ekstrak cair digunakan untuk uji TSP dan pH sedangkan ampasnya untuk uji susut berat kering.

B. Ekstraksi Pelarut Etanol

Ekstraksi menggunakan pelarut etanol dilakukan pada ampas jerami padi hasil ekstraksi pelarut air. Ampas tersebut ditambah dengan pelarut sesuai rasio yang telah ditentukan dan

diekstraksi kembali. Kondisi ekstraksi sama dengan sebelumnya untuk suhu dan kecepatan namun dengan waktu yang bervariasi yaitu selama 2, 4, dan 6 jam. Hasil berupa ekstrak cair akan diuji untuk kadar vanilin sedangkan ampasnya akan dibuang.

3.5.4 Pengujian Ekstrak dan Ampas Jerami Padi

A. Pengujian Total Gula Reduksi (TGR) (Miller, 1959)

Berikut langkah-langkah pengujian total gula reduksi:

- 1) Dibuat larutan glukosa, larutan DNS, larutan campuran DNS dengan glukosa dan larutan campuran DNS dengan aquades.
- 2) Larutan stok glukosa dibuat dengan konsentrasi 1 mg/ml.
- 3) Larutan DNS dibuat dari 250 ml potasium sodium tartate (400mg/ml), 50 ml DNS (100mg/ml) dan 50 ml sodium hidroksida (200mg/ml) dan dilarutkan menjadi satu. Aquades ditambahkan hingga 500ml.
- 4) Larutan campuran DNS dengan glukosa, dilarutkan 1,8 ml larutan DNS dengan 1.8 ml glukosa (konsentrasi 1 mg/ml) pada tabung reaksi.
- 5) Larutan campuran DNS dengan aquades, dilarutkan 1,8 ml larutan DNS dengan 1,8 ml aquades.
- 6) Dibuat larutan standar gula reduksi. Konsentrasi standar glukosa disiapkan yaitu sebesar 0.0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml dan 1 mg/ml.
- 7) Larutan standar dibuat pada 6 tabung reaksi, dimasukkan larutan campuran DNS dan aquades masing-masing sebesar 500 μ l, 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, dan 0 μ l.
- 8) Ditambahkan larutan campuran DNS dan glukosa masing-masing sebesar 0 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, dan 500 μ l.
- 9) Ditambahkan DNS 500 μ l kedalam masing-masing tabung reaksi.
- 10) Tabung reaksi dididihkan selama 15 menit pada *waterbath* dengan ditutup menggunakan alumunium foil.
- 11) Larutan diukur dengan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.
- 12) Absorbansi yang tertera pada Spektrofotometer dicatat kemudian dibuat kurva dengan sumbu x (konstentrasi) dan

sumbu y (absorbansi) sehingga dihasilkan persamaan ($y = mx+c$). Berikut persamaan yang dihasilkan pada kurva larutan standar glukosa:

$$y = mx + c$$

Keterangan :

y = absorbansi

m = gradient

x = gula reduksi (mg/ml)

c = konstanta

- 13) Pengukuran gula reduksi pada hasil ekstrak jerami padi yaitu, 750 μ l DNS ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi yang sebelumnya telah dimasukkan 250 μ l ekstrak jerami padi.
- 14) Tabung reaksi dididihkan selama 15 menit pada *waterbath* dengan ditutup menggunakan alumunium foil.
- 15) Diukur absorbansi dengan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

Absoransi yang didapatkan, disubstitusikan ke dalam rumus (y) sehingga kadar gula reduksi (x) dapat diketahui.

B. Pengujian TSP (Singleton and Rossi, 1965)

Berikut langkah-langkah pengujian TSP:

- 1) Larutan asam galat dibuat, yakni sebanyak 500 μ g asam galat dihomogenkan dengan etanol 96% 10ml. Ditambahkan aquades hingga 100ml, sehingga diperoleh asam galat konsentrasi 5 μ g/ml.
- 2) Larutan Na₂CO₃ dibuat, yakni sebanyak 200g Na₂CO₃ dilarutkan dengan 800 ml aquades. Dididihkan dan dilakukan inkubasi 24 jam, sehingga diperoleh larutan Na₂CO₃ konsentrasi 0,2 g/ml.
- 3) Diukur absorbansi larutan standar fenol dengan menyiapkan 6 tabung reaksi dan dimasukkan aquades yaitu 500 μ l, 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, dan 0 μ l.
- 4) Ditambahkan asam galat 0 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, dan 500 μ l. Ditambahkan lagi 100 μ l larutan *Folin-Ciocalteu* dan dididihkan 8 menit.
- 5) Ditambahkan kembali 400 μ l larutan sodium karbonat (Na₂CO₃).

- 6) Diukur absorbansi menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.
- 7) Nilai absorbansi dimasukkan dalam kurva standar sebagai sumbu y dan konsentrasi larutan standar sebagai sumbu x.
- 8) Pengukuran total fenol terlarut, yakni sampel sebanyak 50 μL dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi.
- 9) Ditambahkan 450 μL aquades.
- 10) Ditambahkan 100 μL reagen *Folin-Ciocalteu*.
- 11) Didiamkan selama 8 menit dan dihomogenkan dengan 400 μL larutan Na_2CO_3 .
- 12) Diukur nilai absorbansi menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Nilai absorbansi tersebut dimasukkan dalam persamaan berikut:

$$y = mx + c$$

Keterangan :

y = absorbansi
 m = gradient
 x = total fenol (mg/g)
 c = konstanta

C. Persentase Penurunan Susut Berat Kering

Ampas bahan hasil ekstraksi dioven dengan suhu 80°C selama sekitar 16-22 jam. Bobot bahan diukur hingga konstan. Penentuan kehilangan susut berat kering dapat dihitung dengan rumus berikut.

Penurunan bobot kering jerami padi hari ke- t (%) (Pitt and Hocking, 2009):

$$\frac{BKO \text{ hari ke } 0 - BKO \text{ hari ke } t}{BKO \text{ hari ke } 0} \times 100\%$$

Keterangan :

BKO = Berat Kering Oven

D. Pengukuran pH pada Ekstrak Sampel (SNI 06-6989.11-2004)

Pengukuran pH pada ekstrak sampel dilakukan menggunakan pHmeter. pHmeter yang digunakan untuk mengukur pH tersebut sebelumnya dikalibrasi menggunakan aquades. Kemudian alat digunakan untuk mengukur sampel

dengan mencelupkannya 1/3 dari larutan ekstrak. Setiap pengukuran dari satu sampel ke sampel lainnya, adaptor selalu dibersihkan dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu.

3.6 Pengukuran Kadar Vanilin dengan Spektrofotometer UV-Vis

Pengujian ini menggunakan spektrofotometer UV-vis dengan langkah awal yaitu pembuatan larutan standar. Sebanyak 0,05 gram vanilin dilarutkan dalam larutan yang terdiri dari 2,5 ml ethyl alcohol dan 50 ml aquades. Kemudian, tabung reaksi sebanyak 6 buah disiapkan dan dimasukkan 0µl, 50µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl larutan vanilin. Masing-masing tabung ditambah aquades sampai volume total 2,5 ml. Larutan tersebut diambil kembali masing-masing 250 µl dan ditambah NaOH 50 µl kemudian dilarutkan dengan aquades sampai volume 2,5 ml. Pembuatan blanko dengan cara NaOH 0,1 N sebanyak 2 mL ditambah 98 ml aquades. Persiapan sampel berupa sampel yang akan diuji diambil sebanyak 50 µl dan ditambah aquades sampai volume 2,5 ml. Sampel yang telah ditambah aquades, diambil 250 µl dan ditambah NaOH 0,1 N sebanyak 50 µl kemudian dilarutkan kembali dengan aquades sampai volume 2,5 ml. NaOH ditambahkan untuk meningkatkan pH dari ekstrak vanilla untuk absorbansi UV. Vanilin alami memiliki pH asam (pH dari 5% larutan vanilin di dalam air adalah 4,3). Kelompok fenol dari vanilin memiliki nilai pK_a sebesar 7,38. Peningkatan pH molekul akan menghilangkan proton, dan larutan menjadi bermuatan negatif sehingga lebih larut dalam air. Absorbansi larutan vanilin ditentukan pada nilai 380 nm. Kadar vanilin dapat dinyatakan sebagai berikut (Rasoamandradhy *et al.*, 2013):

Kadar vanilin (% b/b) = $\frac{X \times Fp}{M \times 10} \times 100\%$, dimana :

X = Konsentrasi larutan contoh (ppm) yang didapat dari kurva kalibrasi standar vanillin.

Fp = Faktor pengenceran

M = Berat sampel (mg)

3.7 Identifikasi Vanillin dengan *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization tandem-Mass Spectrometry* (Modifikasi Ong et al., 2007)

Pengujian vanillin menggunakan *Liquid Chromatography digabungkan dengan Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*. Spesifikasi LC-ESI-MS/MS yang akan digunakan untuk pengujian adalah sebagai berikut:

- a) Mode injeksi berupa partial loop dengan volume injeksi 3.000 μL
- b) Volume aliran (*flush*) 400 μL dan kecepatannya 100.000 $\mu\text{L/s}$
- c) Kecepatan penyemprotan 8.000 $\mu\text{L/s}$
- d) Waktu analisis yang digunakan ± 9 menit

Pengujian diawali dengan preparasi sampel. Sampel diambil dengan pipet sebanyak 200 μL kemudian ditambahkan 1 mL metanol HPLC *grade* dan 100 μL Pb asetat 0,06 M. Selanjutnya, sampel disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Supernatan lalu diambil dan dikeringkan menggunakan oven dengan temperatur 40°C. Setelah kering, ditambahkan metanol sebanyak 3 mL dan disaring dengan filter PTFE 0,2 mikron.

Uji Sampel dilakukan dengan peralatan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi Hypersil Gold (50mm x 2.1mm x 1.9 μm). UHPLC merk ACCELLA type 1250 buatan Thermo Scientific yang terdiri dari degasser vakum, pompa quartener, autosampler termostatik dikendalikan Personal computer melalui program x-calibur 2.1. Pelarut A = 0,1% asam format dalam Air dan B = 0,1% asam formiat dalam acetonitrile. Gradient fase gerak dengan kecepatan 250 $\mu\text{L}/\text{menit}$ dengan pengaturan komposisi pada table 1. Volume injeksi pada LC adalah 2 μL . Kolom dikontrol pada 30°C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 16°C.

Tabel 3.4. Komposisi untuk gradient fase gerakidentifikasi vanillin menggunakan LC-ESI-MS/MS

| No. | Time | A% | B% |
|-----|------|------|------|
| 0 | 0,00 | 85,0 | 15,0 |
| 1 | 1,15 | 85,0 | 15,0 |
| 2 | 2,75 | 50,0 | 50,0 |
| 3 | 3,40 | 50,0 | 50,0 |
| 4 | 3,50 | 85,0 | 15,0 |
| 5 | 5,00 | 85,0 | 15,0 |

Pengujian kromatografi menggunakan LC TSQ Quantum Accela 1250 system dari Thermo Scientific. Setelah pengujian kromatografi, selanjutnya dilakukan uji ESI MS/MS sebagai uji lanjutan dari LC. ESI MS/MS digunakan untuk mengetahui bentuk positif dan negatif dari massa spektrum ion sehingga dapat menentukan massa molekul dari senyawa yang diuji. Pengujian ESI MS/MS menggunakan Triple Quadrupole MS TSQ Quantum Access Max dari Thermo Scientific. ESI dan sumber ESI diatur dalam mode ion negatif. Parameter sumber ESI untuk rentang pemindaian massa adalah 100-800 dengan suhu kapiler 350°C, kecepatan aliran gas dan tekanan untuk pendingin dan nitrogen pelengkap masing-masing adalah 10 L/menit dan 50psi. Penggunaan MS/MS Triple Q (quadrupole) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi ESI (Electrospray Ionization) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dioperasikan dengan mode Positive. Penentuan kuantitas dengan metode SRM (Selected Reaction Monitoring) diatur pada 153 m/z sebagai ion precursor dan 93 m/z sebagai ion produk kuantitatif. Kondisi ionisasi ESI adalah sebagai berikut: tegangan spray 3 kV ; Suhu penguapan 250 °C; Suhu kapiler, 300 °C; nitrogen sebagai sheath gas pressure 40 psi, dan Aux gas pressure 10 psi dengan gas argon.

3.8 Pengolahan dan Analisis Data

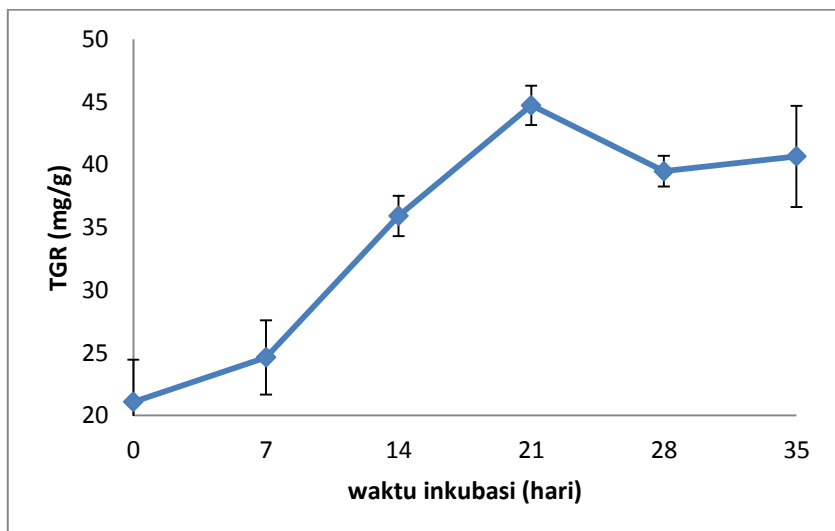
Data hasil ekstraksi jerami padi dengan faktor pelarut etanol dan lama ekstraksi akan diolah serta dianalisa optimasinya menggunakan *Response Surface Method* (RSM). *Software* yang digunakan adalah *design expert* (version 10.0.6).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Lama Inkubasi Terhadap Hasil Degradasi Jerami Padi

4.1.1 Total Gula Reduksi (TGR) Hasil Degradasi Jerami Padi

Nilai TGR seperti **Gambar 4.1** dihitung berdasarkan berat kering serta menunjukkan hasil yang fluktuatif meskipun tidak signifikan. Inkubasi selama 0 hari sampai 21 hari menunjukkan nilai TGR yang meningkat namun menurun pada inkubasi selama 28 hari. Nilai TGR kembali mengalami sedikit peningkatan pada inkubasi selama 35 hari. Nilai TGR tertinggi yaitu 44,722 mg/g dengan inkubasi selama 21 hari sedangkan nilai TGR terendah yaitu 21,077 dengan inkubasi selama 0 hari. Peningkatan nilai TGR dari hari ke-0 sampai hari ke-7, ke-14, dan ke-21 masing-masing sebesar 16,79%, 45,84%, dan 24,56%. Nilai TGR turun pada hari ke-28 sebesar 11,76% dan terjadi peningkatan kembali pada hari ke-35 sebesar 3%.

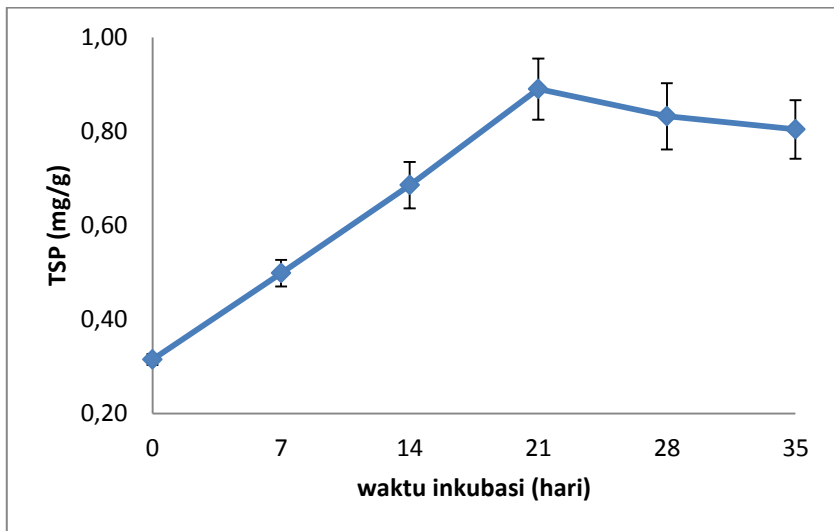


Gambar 4.1 Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap rata-rata TGR jerami padi. *Error bar* menunjukkan standar *error* dari lima ulangan.

Jamur pelapuk coklat diketahui menyebabkan depolimerasi hemiselulosa dan selulosa secara cepat dan intensif serta memproduksi hidrolisis asam dan asam oksalat (Olivera *et al.*, 2010). Hasil degradasi selulosa dan hemiselulosa lainnya adalah gula yang menyebabkan nilai TGR meningkat. Menurut Wang *et al.* (2017), hemiselulosa dan selulosa utamanya terkonversi menjadi keton, asam, karbonil, gula, dan furan. Penurunan nilai TGR disebabkan hasil degradasi selulosa juga dipakai oleh jamur. Menurut Perez *et al.* (2002) produk dari hidrolisis selulosa banyak yang tersedia sebagai sumber karbon dan energi bagi mikroorganisme selulolitik atau mikroba lain yang tinggal di lingkungan dimana selulosa terdegradasi.

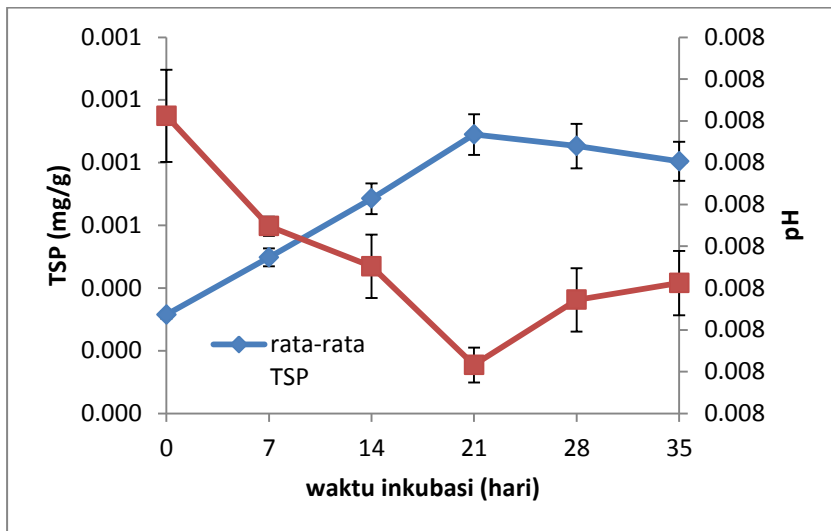
4.1.2 Total Soluble Phenol (TSP) Hasil Degradasi Jerami Padi

Nilai TSP hasil degradasi jerami padi oleh jamur *Serpula lacrymans* selama 35 hari dapat dilihat pada **Gambar 4.2**. Inkubasi selama 0 hari sampai 21 hari menunjukkan nilai TSP yang terus meningkat dan menurun pada inkubasi hari ke-28 dan hari ke-35. Nilai TSP terendah pada inkubasi selama 0 hari yaitu 0,315 mg/g dan meningkat menjadi 0,498 mg/g atau sebesar 58,26% pada hari ke-7. Peningkatan terus terjadi pada hari ke-14 sebesar 0,685 mg/g dengan persentase sebesar 37,53%. TSP tertinggi pada inkubasi selama 21 hari yaitu 0,890 mg/g atau meningkat sebesar 29,83%. Hari ke-28 dan 35 terjadi penurunan sebesar 0,853 mg/g dan 0,804 mg/g atau 4,13% dan 5,73%.



Gambar 4.2 Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap rata-rata TSP jerami padi. *Error bar* menunjukkan standar *error* dari lima ulangan.

Jamur pelapuk coklat lebih dulu mendegradasi selulosa dan hemiselulosa, kemudian memodifikasi lignin di akhir (Ray *et al.*, 2010). Menurut Clark (2007), lignin, salah satu komponen biomasa, akan diubah menjadi hidrokarbon aromatis yang berharga untuk bahan bakar dan kimia karena struktur aromatisnya. Pirolisis lignin dapat menghasilkan *yield* lebih besar dari fenol dan fenolik (Jiang *et al.*, 2010). Jadi, lignin perlu waktu untuk terdegradasi menjadi senyawa yang berguna salah satunya senyawa fenol. Peningkatan nilai TSP terjadi karena lignin yang telah didegradasi menjadi senyawa fenol melalui reaksi Fenton. Penurunan TSP disebabkan karena fenol yang telah dihasilkan juga dikonsumsi oleh jamur. Menurut Aguiar *et al.* (2013), jamur pelapuk coklat diketahui memproduksi sejumlah asam oksalat untuk melarutkan besi dan menginisiasi reaksi Fenton. Hasil reaksi Fenton tersebut adalah OH radikal yang dapat berkontribusi untuk memodifikasi lignin. Sementara, fenol dari lignin dapat dikonsumsi oleh jamur, menurunkan aktivitas reduksi dari Fe^{3+} .



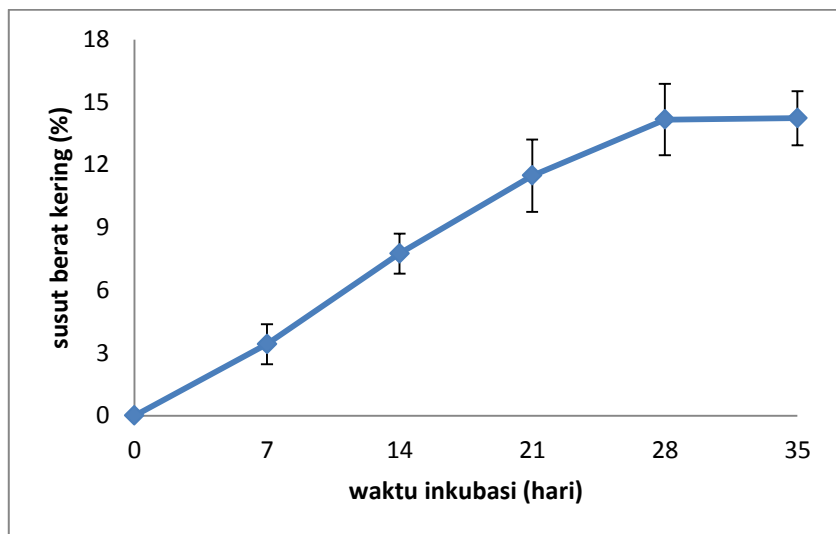
Gambar 4.3 Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap rata-rata TSP dan pH jerami padi. *Error bar* menunjukkan standar *error* dari lima ulangan.

Nilai TSP dan pH memiliki hubungan yang berlawanan seperti **Gambar 4.3**. Jika nilai TSP yang semakin meningkat maka nilai pH akan semakin turun. Nilai pH yang turun menandakan telah terjadinya reaksi fenton. Menurut Hastrup *et al.* (2006), kondisi pH yang menandai adanya asam oksalat sangat berpengaruh pada proses reduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dalam reaksi Fenton. Asam oksalat akan bereaksi dengan Fe^{3+} membentuk ikatan Fe-Oksalat pada kondisi asam (pH rendah). Berdasarkan literatur tersebut, nilai pH yang turun karena jamur menghasilkan asam oksalat yang berperan dalam reaksi fenton. Reaksi fenton inilah yang akan mendegradasi lignin sehingga nilai TSP naik.

4.1.3 Susut Berat (*Weight Loss*) Hasil Degradasi Jerami Padi

Susut berat meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi namun nilai susut berat tidak mengalami perubahan pada inkubasi hari ke-35. Susut berat mengalami peningkatan

pada hari ke-7 sebesar 3% dan terus meningkat pada hari ke-14 sebesar 7%, hari ke-21 sebesar 11%, dan hari ke-28 sebesar 14%. Inkubasi hari ke-35 menghasilkan nilai susut berat yang sama dengan hari ke-28 yaitu 14%. Grafik pengaruh waktu inkubasi terhadap nilai susut berat jerami padi dapat dilihat pada **Gambar 4.4**.

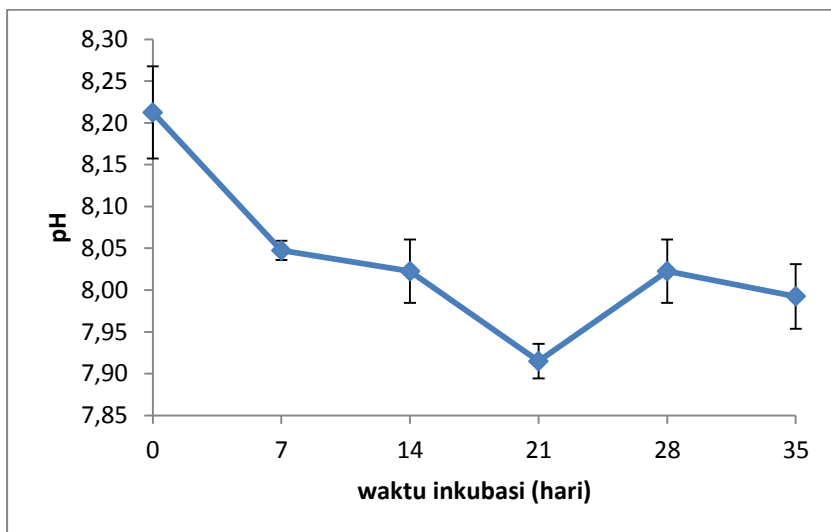


Gambar 4.4 Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap susut berat jerami padi. *Error bar* menunjukkan standar *error* dari lima ulangan.

Susut berat akan meningkat seiring dengan waktu inkubasi yang disebabkan oleh degradasi jamur pelapuk coklat. Secara umum, susut berat disebabkan oleh serangan jamur yang bergantung pada waktu yang diperlukan koloni jamur dan juga tingkat degradasi komponen dinding sel tanaman (weiheand et al., 2008). Kehilangan susut berat karena jamur pelapuk coklat mendegradasi selulosa, hemiselulosa, dan lignin menjadi senyawa yang lebih sederhana. Ketika periode degradasi diperpanjang, kehilangan berat sampel secara bertahap meningkat karena depolimerisasi karbohidrat yang signifikan serta kandungan lignin (Durmaz *et al.*, 2016).

4.1.4 Nilai pH Hasil Degradasi Jerami Padi

Nilai pH mengalami penurunan pada inkubasi selama 0 hari sampai 21 hari kemudian mengalami peningkatan pada inkubasi hari ke-28 dan hari ke-35 namun tidak signifikan. Inkubasi 0 hari menghasilkan pH tertinggi yaitu 8,213 dan pH terus menurun pada hari ke-7 sebesar 2%, hari ke-14 sebesar 0,31%, dan hari ke-21 sebesar 1,65%. Nilai pH kembali naik pada hari ke-28 sebesar 1,67% dan turun pada hari ke-35 sebesar 0,3%. Grafik pengaruh waktu inkubasi terhadap nilai pH jerami padi dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.



Gambar 4.5 Pengaruh lama inkubasi (hari) terhadap pH jerami padi. *Error bar* menunjukkan standar *error* dari lima ulangan.

Nilai pH yang menurun karena jamur terus menghasilkan asam oksalat selama proses degradasi lignoselulosa. Menurut Hastrup *et al.* (2011), asam oksalat yang dihasilkan oleh jamur pelapuk coklat akan menjadikan kondisi asam sehingga menurunkan nilai pH. Asam oksalat dan pH berpengaruh dalam reaktivitas dari Fe^{3+} yang digunakan pada reaksi fenton. Nilai pH yang naik pada hari ke-28 disebabkan jamur pelapuk coklat dapat menurunkan tingkat oksalat yang dihasilkan. Menurut

Schilling dan Jellison (2005), jamur pelapuk coklat diketahui dapat menurunkan tingkat oksalat jika oksalat yang ada berlebihan melalui *oxalate decarboxylase* (ODC). Tingkat optimasi oksalat juga dibutuhkan oleh jamur pelapuk coklat untuk menyeimbangkan reaksi Fenton dan meminimalkan kerusakan oksidatif pada enzim dan hifa (Varela dan Tien, 2003).

4.2 Optimasi Hasil Degradasi Jerami Padi

Optimasi hasil degradasi jerami padi dilakukan pada lama inkubasi dengan nilai TSP tertinggi. Parameter tersebut dipilih karena vanilin merupakan salah satu turunan dari lignin sedangkan lignin yang terdegradasi dapat dilihat dari nilai TSP. Nilai TSP yang tinggi menunjukkan banyak lignin yang terdegradasi menjadi senyawa yang lebih sederhana dan diasumsikan salah satunya menjadi vanilin. Nilai tsp tertinggi sesuai **Gambar 4.1** diperoleh dengan inkubasi selama 21 hari. Optimasi menggunakan faktor lama ekstraksi dan volume pelarut dengan respon yaitu kadar vanilin dan yield vanilin.

4.2.1. Respon Kadar Vanilin

Kadar vanilin yang diperoleh masing-masing perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 4.1**. Nilai kadar vanilin tertinggi diperoleh sebesar 0,1607 mg/g dengan volume etanol 40 ml dan waktu ekstraksi 240 menit. Variabel etanol 68,28 ml dan waktu ekstraksi 240 menit menghasilkan kadar vanilin terendah sebesar 0,0135 mg/g.

Tabel 4.1 Data optimasi respon kadar vanilin hasil ekstraksi ampas jerami padi oleh jamur *Serpula lacrymans*

| No | Variabel Kode | | Variabel Asli | | Respon |
|-----|----------------|----------------|--------------------|------------------------|-------------------|
| | X ₁ | X ₂ | Volume etanol (ml) | Lama ekstraksi (menit) | Kadar vanilin (%) |
| 1. | -1 | -1 | 20 | 120 | 0,0139 |
| 2. | 1 | -1 | 60 | 120 | 0,0144 |
| 3. | -1 | 1 | 20 | 360 | 0,0200 |
| 4. | 1 | 1 | 60 | 360 | 0,0177 |
| 5. | -1,414 | 0 | 11,72 | 240 | 0,0188 |
| 6. | 1,414 | 0 | 68,28 | 240 | 0,0135 |
| 7. | 0 | -1,414 | 40 | 70,32 | 0,0325 |
| 8. | 0 | 1,414 | 40 | 409,68 | 0,0669 |
| 9. | 0 | 0 | 40 | 240 | 0,1235 |
| 10. | 0 | 0 | 40 | 240 | 0,1607 |
| 11. | 0 | 0 | 40 | 240 | 0,1157 |
| 12. | 0 | 0 | 40 | 240 | 0,1496 |
| 13. | 0 | 0 | 40 | 240 | 0,1316 |

Hasil yang tertera pada **Lampiran 15** menghasilkan model kuadratik yang disarankan. Hal tersebut dikarenakan nilai p yaitu $<0,0001$ lebih kecil dari 0,05 yang artinya model signifikan. Menurut Mostafaei *et al.* (2016), signifikansi setiap model dinilai sesuai dengan nilai p yang sesuai. Nilai p-kurang dari 0,0001 menunjukkan signifikansi model, sedangkan nilai yang lebih besar dari 0,05 menunjukkan bahwa model tersebut tidak signifikan.

Analisis anova pada **Lampiran 15** menghasilkan nilai p model sebesar 0,0002 lebih kecil dari 0,05 yang artinya model kuadratik signifikan. Nilai p pada volume etanol (A) sebesar 0,8545 dan lama ekstraksi sebesar 0,2759 yang mana nilai keduanya lebih besar dari 0,05. Hal tersebut menunjukkan bahwa faktor tersebut tidak berpengaruh signifikan. Interaksi antara kedua faktor (AB) juga tidak berpengaruh signifikan karena memiliki nilai p 0,9380 lebih besar dari 0,05. Interaksi antar faktor volume ekstraksi (A2) memiliki nilai p $<0,0001$ dan faktor waktu ekstraksi (B2) memiliki nilai p 0,0002. Keduanya signifikan karena nilai p lebih kecil dari 0,05. Nilai p pada *lack of*

fit sebesar 0,5942 lebih besar dari 0,05 dan memiliki keterangan tidak signifikan.

Nilai R^2 diperoleh sebesar 0,9495 yang artinya faktor volume etanol dan waktu ekstraksi mempengaruhi respon kadar vanilin sebesar 94,95% dan sisanya 5,05% dipengaruhi oleh faktor lain seperti jenis pelarut dan suhu. Menurut Shakeel *et al.* (2015), beberapa jenis pelarut yang ramah lingkungan seperti *transcutol*, *propylene glycol* (PG), dan *polyethylene glycol*-400 (PEG-400) dapat melarutkan beberapa senyawa organik salah satunya vanilin. Suhu juga dapat mempengaruhi kelarutan vanilin pada beberapa pelarut yang telah disebutkan.

Persamaan polinomial diperoleh dalam dua bentuk yaitu variabel kode dan variabel aktual. Persamaan variabel kode dari respon kadar vanilin sebagai berikut,

$$Y = 6,19 - 0,05X_1 + 0,33X_2 - 0,03X_1X_2 - 2,92 X_1^2 - 2,15 X_2^2 \dots\dots\dots(3)$$

Berdasarkan persamaan 3, faktor volume etanol (X_1) memiliki koefisien negatif artinya faktor volume etanol yang tinggi akan menurunkan respon kadar vanilin. Faktor waktu ekstraksi memiliki nilai koefisien positif artinya faktor waktu ekstraksi yang tinggi akan meningkatkan respon kadar vanilin. Selain itu nilai faktor waktu ekstraksi lebih besar dari nilai faktor volume etanol artinya kadar vanilin lebih dipengaruhi oleh waktu ekstraksi dibandingkan dengan volume etanol. Persamaan variabel actual kadar vanilin sebagai berikut,

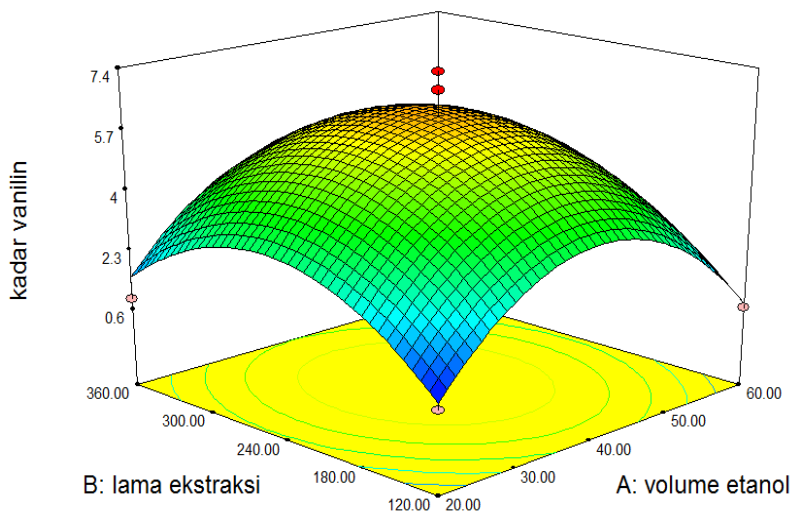
$$Y = -14,76 + 0,58X_1 + 0,07X_2 - 1,32(10^{-5})X_1X_2 - 7,29(10^{-3})X_1^2 - 1,49(10^{-4})X_2^2 \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

Y = variabel respon kadar vanilin

X_1 = volume etanol

X_2 = waktu ekstraksi



Gambar 4.6 Kurva hubungan volume etanol dan waktu ekstraksi terhadap respon kadar vanilin

Kurva yang tampak pada **Gambar 4.6** menunjukkan bentuk yang melengkung ke atas dengan warna kuning pada titik puncak. Pada titik puncak tersebut mengartikan bahwa kadar vanilin semakin tinggi (maksimal). Sebuah plot kontur melingkar menunjukkan interaksi non-signifikan antara variabel sedangkan plot kontur elips menunjukkan interaksi timbal balik yang signifikan dari variabel eksperimental (Firdous *et al.*, 2017).

Volume pelarut dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap kadar vanilin. Penambahan volume pelarut akan meningkatkan kadar vanilin yang diperoleh namun pada batas optimal. Volume pelarut yang semakin tinggi akan meningkatkan kadar vanilin yang diperoleh dikarenakan transfer massa dan efisiensi ekstraksi meningkat (Dong *et al.*, 2014). Faktor waktu ekstraksi juga berpengaruh terhadap kadar vanilin pada batas optimal. Hal ini disebabkan pelarut akan mendidih dengan bertambahnya waktu ekstraksi sehingga pelarut dapat mudah menempel pada dinding dan akan menyentuh zat terlarut (Dong *et al.*, 2014). Menurut Molina *et al.* (2012), etanol digunakan sebagai pelarut

organik untuk menghindari pelarut beracun seperti *methanol*, *acetonitrilate*, kloroform atau *hexane*, karena potensi penggunaan dari zat yang diekstrak akan digunakan oleh manusia. Selain itu, pH asam dibutuhkan untuk meningkatkan hidrolisis struktur polimer dan melepaskan metabolit berbentuk monomer, serta mudah larut dengan pelarut etanol.

4.2.2 Respon *Yield* Vanilin

Kombinasi kedua variabel menghasilkan nilai respon *yield* vanilin yang dapat dilihat pada **Tabel 4.2**. Nilai *yield* vanilin tertinggi diperoleh sebesar 2,995 µg/g dengan volume etanol 40 ml dan waktu ekstraksi 240 menit. Variabel etanol 68,28 ml dan waktu ekstraksi 240 menit menghasilkan kadar vanilin terendah sebesar 0,114 µg/g.

Tabel 4.2 Data optimasi respon *yield* vanilin hasil ekstraksi ampas jerami padi oleh jamur *Serpula lacrymans*

| No | Variabel Kode | | Variabel Asli | | Respon |
|-----|----------------|----------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | Volume etanol (ml) | Lama ekstraksi (menit) | <i>yield</i> Vanilin (µg/g) |
| 1. | -1 | -1 | 20 | 120 | 0,121 |
| 2. | 1 | -1 | 60 | 120 | 0,130 |
| 3. | -1 | 1 | 20 | 360 | 0,178 |
| 4. | 1 | 1 | 60 | 360 | 0,163 |
| 5. | -1,414 | 0 | 11,72 | 240 | 0,162 |
| 6. | 1,414 | 0 | 68,28 | 240 | 0,114 |
| 7. | 0 | -1,414 | 40 | 70,32 | 0,685 |
| 8. | 0 | 1,414 | 40 | 409,68 | 1,207 |
| 9. | 0 | 0 | 40 | 240 | 2,412 |
| 10. | 0 | 0 | 40 | 240 | 2,995 |
| 11. | 0 | 0 | 40 | 240 | 2,190 |
| 12. | 0 | 0 | 40 | 240 | 2,773 |
| 13. | 0 | 0 | 40 | 240 | 2,596 |

Hasil pengolahan data menghasilkan model kuadratik adalah model yang disarankan sesuai pada **Lampiran 16**. Hal tersebut dikarenakan nilai p yaitu <0,0001 lebih kecil dari 0,05 yang artinya model signifikan. Analisis anova menghasilkan nilai

p model sebesar $<0,0001$ lebih kecil dari 0,05 yang artinya model kuadratik signifikan. Nilai p pada volume etanol (A) sebesar 0,9919 dan waktu ekstraksi sebesar 0,2692 yang mana nilai keduanya lebih besar dari 0,05. Hal tersebut menunjukkan bahwa faktor tersebut tidak berpengaruh signifikan. Interaksi antara kedua faktor (AB) juga tidak berpengaruh signifikan karena memiliki nilai p 0,9640 yang lebih besar dari 0,05. Interaksi antar faktor volume ekstraksi (A^2) memiliki nilai p $<0,0001$ dan faktor waktu ekstraksi (B^2) memiliki nilai p $<0,0001$. Keduanya signifikan karena nilai p lebih kecil dari 0,05. Nilai p pada *lack of fit* sebesar 0,7986 lebih besar dari 0,05 dan memiliki keterangan tidak signifikan.

Nilai R^2 diperoleh sebesar 0,9729 yang artinya faktor volume etanol dan lama ekstraksi mempengaruhi respon kadar vanilin sebesar 97,29% dan sisanya 2,71% dipengaruhi oleh faktor lain seperti jenis ekstraksi dan rasio antar pelarut dengan bahan. Menurut Dong *et al.* (2014), beberapa metode ekstraksi seperti microwave-assisted extraction (MAE) dapat digunakan untuk ekstraksi vanilla dalam menghasilkan yield vanilin yang lebih tinggi dengan waktu ekstraksi yang lebih singkat daripada ekstraksi konvensional.

Persamaan polinomial diperoleh dalam dua bentuk yaitu variabel kode dan variabel aktual. Persamaan variabel kode dari respon *yield* vanilin sebagai berikut,

$$Y = 2,59 - 9,58(10^{-4})X_1 + 0,11X_2 - 6,17(10^{-3})X_1X_2 - 1,25 X_1^2 - 1,13 X_2^2 \dots\dots\dots(5)$$

Berdasarkan persamaan 5, faktor volume etanol (X_1) memiliki koefisien negatif artinya faktor volume etanol yang tinggi akan menurunkan respon *yield* vanilin. Faktor waktu ekstraksi memiliki nilai koefisien positif artinya faktor waktu ekstraksi yang tinggi akan meningkatkan respon *yield* vanilin. Selain itu nilai faktor waktu ekstraksi lebih besar dari nilai faktor volume etanol artinya *yield* vanilin lebih dipengaruhi oleh waktu ekstraksi dibandingkan dengan volume etanol. Persamaan variabel aktual *yield* vanilin sebagai berikut,

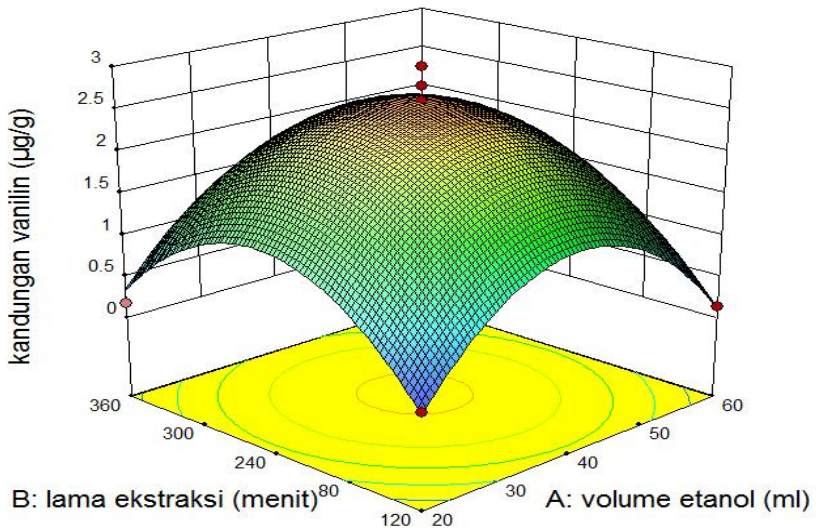
$$Y = -7,16 + 0,25X_1 + 0,03X_2 - 2,57(10^{-6})X_1X_2 - 3,12(10^{-3})X_1^2 - 7,84(10^{-5})X_2^2 \dots\dots\dots(6)$$

Keterangan:

Y = variabel respon kadar vanilin

X_1 = volume etanol

X_2 = waktu ekstraksi



Gambar 4.7 Kurva hubungan volume etanol dan waktu ekstraksi terhadap respon *yield* vanilin

Kurva yang tampak pada **Gambar 4.7** menunjukkan bentuk yang melengkung ke atas dengan warna kuning pada titik puncak. Pada titik puncak tersebut mengartikan bahwa *yield* vanilin semakin tinggi (maksimal). Semakin bertambah volume etanol dan lama ekstraksi pada batas optimal maka *yield* vanilin juga meningkat. Volume etanol diatas 40 ml dan lama ekstraksi diatas 247 menit mulai menunjukkan penurunan *yield* vanilin yang diperoleh.

Yield vanilin meningkat sesuai dengan volume pelarut yang bertambah sampai batas optimum yang dicapai. Hal tersebut mungkin disebabkan perbedaan konsentrasi antara bahan dan pelarut yang memudahkan transfer masa dan meningkatkan efisiensi ekstraksi (Qu *et al.*, 2010). Lama ekstraksi juga akan berpengaruh terhadap *yield* vanilin yang diperoleh. Waktu ekstraksi yang semakin meningkat akan

mempercepat pergerakan molekul bahan dan koefisien difusi secara signifikan. Pelarut juga memiliki waktu yang lebih lama dalam melarutkan bahan. Pelarut akan masuk diantara matriks dengan cara memecah matriks tersebut sehingga senyawa dalam bahan akan keluar (Dong *et al.*, 2014).

4.2.3 Solusi Optimal Respon Kadar Vanilin

Solusi optimal ditentukan menggunakan faktor volume etanol dan waktu ekstraksi. Volume etanol memiliki batas bawah 30 ml dan batas atas 50 ml. waktu ekstraksi memiliki batas bawah 180 menit dan batas atas 300 menit. Penentuan batas-batas seperti **Tabel 4.3** diperoleh dari kurva untuk respon kadar vanilin dan *yield* vanilin.

Tabel 4.3 Batas optimasi respon kadar vanilin

| Kriteria | Nama | Tujuan | Batas Penelitian | | Kepentingan |
|----------|--|-----------------|------------------|-------|-------------|
| | | | Bawah | Atas | |
| Faktor | Volume etanol (ml) | <i>In range</i> | 30 | 50 | 3 |
| Faktor | Waktu ekstraksi (menit) | <i>In range</i> | 180 | 300 | 3 |
| Respon | Kadar vanilin (%) | Maksimum | 0,611 | 7,300 | 5 |
| Respon | <i>Yiled</i> vanilin ($\mu\text{g/g}$) | Maksimum | 0,114 | 2,995 | 5 |

Keterangan:

1 = sangat tidak penting 2 = tidak penting 3 = cukup penting
4 = penting 5 = sangat penting

Solusi optimal seperti **Tabel 4.4** menghasilkan perlakuan optimal berupa volume etanol sebesar 39,91 ml dan waktu ekstraksi selama 247,46 menit. Respon kadar vanilin yang diperoleh sesuai perlakuan tersebut yaitu 6,20% serta *yield* vanilin sebesar 2,59 $\mu\text{g/g}$ dengan desirability sebesar 0,839 atau 83,9%. Menurut Montgomery (2009), fungsi *desirability* untuk menentukan derajat ketepatan hasil solusi optimal. Konsepnya yaitu semakin mendekati nilai 1 maka semakin tinggi ketepatan optimasinya.

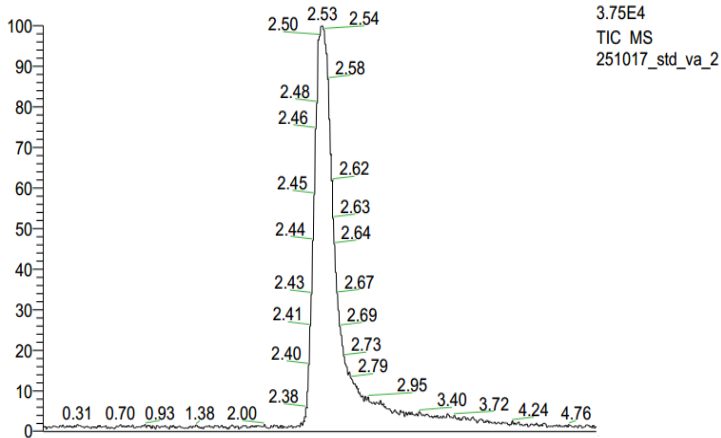
Tabel 4.4 Hasil solusi optimal

| Kriteria | Parameter | Standar prediksi |
|--------------------------|--|------------------|
| Respon | Volume etanol (ml) | 39,91 |
| Respon | Waktu ekstraksi (menit) | 247,46 |
| Faktor | Kadar vanilin (%) | 6,20 |
| Faktor | <i>Yield</i> vanilin ($\mu\text{g/g}$) | 2,59 |
| Ketepatan (desirability) | - | 0,83 |
| keterangan | - | <i>selected</i> |

4.3 Identifikasi Senyawa Vanilin

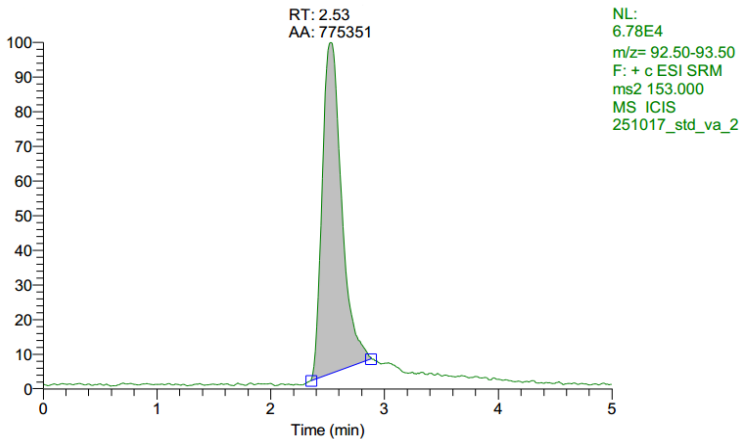
Sampel dengan perlakuan optimal akan diidentifikasi senyawa vanilin menggunakan LC MS/MS. Identifikasi ini menggunakan standar vanilin yang mana memiliki berat molekul sebesar 152 m/z. Hasil identifikasi diperoleh bahwa ion prekursor senyawa vanilin adalah 153,00 m/z sedangkan ion produk vanilin adalah 92,50-93,50 m/z. Ion prekursor adalah ion terbentuk dengan menghilangkan satu atau lebih elektron dari sebuah molekul untuk membentuk ion positif atau penambahan satu atau lebih elektron ke molekul untuk membentuk ion negatif. Ion produk adalah ion yang terbentuk sebagai hasil reaksi yang melibatkan ion prekursor tertentu dan muncul dalam bentuk *peak* (Meybodi *et al.*, 2014).

RT: 0.00 - 5.00 SM: 3B



NL:
3.75E4
TIC MS
251017_std_va_2

(a)



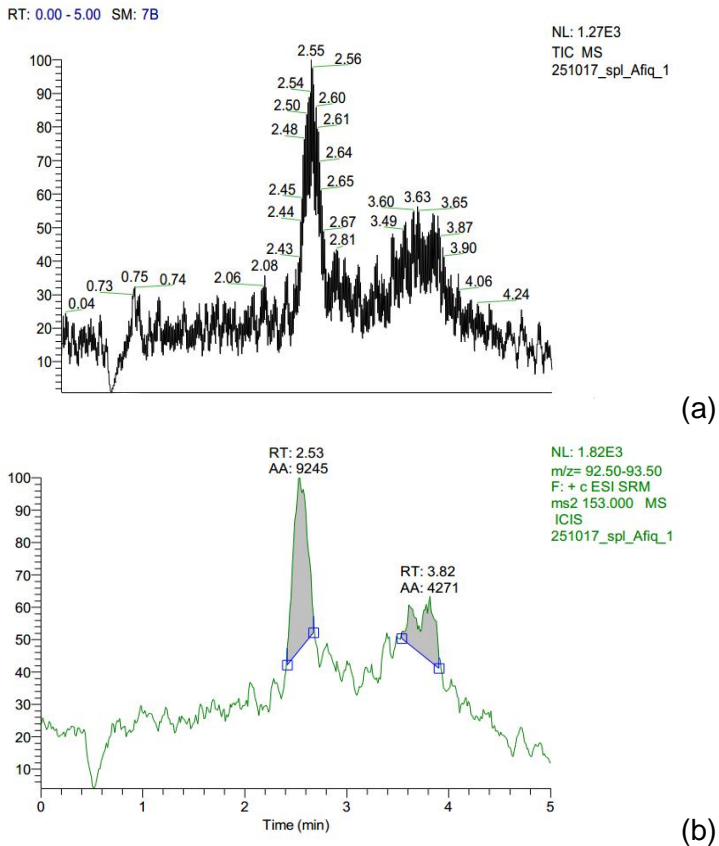
NL:
6.78E4
m/z= 92.50-93.50
F: + c ESI SRM
ms2 153.000
MS ICIS
251017_std_va_2

(b)

Gambar 4.8 Kromatogram standar vanilin

Gambar 4.8a menunjukkan kromatogram ion prekursor standar vanilin dan **Gambar 4.8b** adalah ion produk standar vanilin. Kromatogram ion produk standar vanilin memiliki *retention time* (RT) selama 2,53 menit dari waktu analisa 5 menit. Hasil kromatogram ekstrak jerami padi ditunjukkan pada **Gambar 4.9a** sebagai ion prekursor sedangkan ion produk pada

Gambar 4.9b. Ion produk ekstrak jerami padi juga memiliki RT sebesar 2,53 menit. Waktu retensi senyawa dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa tersebut dalam analisis kualitatif dan kuantitatif. Akibatnya, kemampuan sistem untuk menghubungkan senyawa ke waktu retensi adalah penting. Waktu retensi yang diperoleh pada penelitian ini lebih cepat dibandingkan dengan waktu retensi untuk senyawa vanilin pada penelitian Shen *et al.*, (2012). Hal tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan total waktu ananlisi yang digunakan.



Gambar 4.9 Kromatogram sampel ekstrak jerami padi

Sampel berupa ekstrak jerami padi yang diujikan terdeteksi vanilin karena memiliki RT yang sama standar vanilin. Namun jumlah vanilin pada ekstrak jerami padi tidak dapat diukur karena jumlahnya terlalu kecil. Menurut Bystrom *et al.* (2008), komponen fenolik tidak terdeteksi kemungkinan karena pada bahan hanya mengandung sedikit atau memang tidak mengandung sama sekali komponen fenolik yang dimaksud. Menurut Kaur dan Chakraborty (2013), kandungan vanillin pada jerami padi berdasar berat kering sekitar 0,012% dan berdasar berat sampel yang terdegradasi secara kimiawi, kandungan vanillin pada jerami padi sekitar 0,009%. Vanilin yang tidak dapat diukur mungkin dikarenakan jumlah sampel yang didegradasi sedikit sehingga menghasilkan ekstrak yang sedikit pula.

Tabel 4.5 Kondisi analitis hasil LC-MS/MS senyawa fenolik

| Senyawa | Waktu retensi (menit) | Total waktu analisis (menit) | Berat molekul (m/z) |
|---------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|
| Vanilin | 5,54 | 14 | 153 |
| Ethyl vanilin | 5,99 | 14 | 167 |
| Koumarin | 6,16 | 14 | 147 |

Sumber: Shen *et al.* (2014)

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil degradasi jerami padi dengan parameter TSP dan TGR menunjukkan nilai tertinggi pada inkubasi 21 hari. Nilai TSP tertinggi diperoleh sebesar 0,890 mg/g sedangkan TGR sebesar 44,722 mg/g. Parameter pH diperoleh nilai pH terendah yaitu 7,915 pada inkubasi 21 hari meskipun terjadi fluktuasi nilai pH yang tidak signifikan tiap minggu. Nilai susut berat terus mengalami peningkatan sampai inkubasi 28 hari namun tidak mengalami peningkatan pada inkubasi 35 hari. Jadi degradasi jerami padi inkubasi 21 hari akan digunakan untuk optimasi volume etanol dan lama ekstraksi.

Optimasi hasil degradasi jerami padi menggunakan respon kadar vanilin dan kandungan vanilin. Metode optimasi menggunakan response surface method yang akan diperoleh solusi optimal. Hasil optimasi menunjukkan volume etanol sebesar 39,91 ml dan lama ekstraksi 4 jam 7 menit 46 detik. Kombinasi faktor tersebut menghasilkan kadar vanilin 6,205% dan kandungan vanilin 2,596 µg/g. Sampel dengan hasil optimal akan diidentifikasi senyawa vanilin menggunakan LC-ESI-MS/MS. Hasil identifikasi sampel tersebut menunjukkan terdapat senyawa vanilin namun tidak dapat diukur yang kemungkinan disebabkan oleh jumlah yang sangat sedikit.

5.2 Saran

Penggunaan faktor lain seperti jenis pelarut, suhu, dan metode ekstraksi. Penambahan respon seperti konsentrasi vanilin dan produktivitas vanilin. Selain itu, penelitian selanjutnya bisa mempertimbangkan jumlah bahan ataupun menggunakan bahan selain jerami padi.

Daftar Pustaka

- Abraham, A., Mathew, A. K., Sindhu, R., Pandey, A., dan Binod, P. 2016. ***Potential of Rice Straw for Bio-Refining: an Overview***. Bioresource Technology. 215: 29-36.
- Aguiar, A., Gavioli, D., dan Ferraz, A. 2013. ***Extracellular Activities and Wood Component Losses During Pinus Taeda Biodegradation by the Brown-Rot Fungus Gloeophyllum trabeum***. International Biodeterioration & Biodegradation. 82: 187-191.
- Arantes, V., Jellison, J., dan Goodell, B. 2012. ***Peculiarities of Brown-Rot Fungi and Biochemical Fenton Reaction With Regard to Their Potential as a Model for Bioprocessing Biomass***. Applied Microbiology and Biotechnology. 94: 323-328.
- Arantes V., Qian, Y., Milagres, A. M. F., Jellison, J., Goodell, B. 2009. ***Effect of pH and Oxalic Acid on the Reduction of Fe³⁺ by a Biomimetic Chelator and on Fe³⁺ Desorption/ Adsorption on to Wood: Implications for Brown-rot Decay***. International Biodeterior. Biodegradation 63: 478–483.
- Araujo, J. D. P., Grande, C. A., dan Rodrigues, A. E. 2010. ***Vanillin Production From Lignin Oxidation In a Batch Reactor***. Chemical Engineering Research and Design. 88: 1024-1032.
- Asina, F., Brzonova, I., Voeller, K., Kozliak, E., Kubatova, A., Yao, B., dan Ji, Y. 2016. ***Biodegradation of Lignin by Fungi, Bacteria and Laccases***. Bioresource Technology. 220: 414-424.

- Bae, I. K., Ham, H. M., Jeong, M. H., Kim, D. H., dan Kim, H. J. 2015. ***Simultaneous Determination of 15 Phenolic Compounds and Caffeine in Teas and Mate Using RP-HPLC/UV Detection: Method Development and Optimization of Extraction Process***. Food Chemistry. 172: 469-475.
- Bastide, I. F., Palama, T. L., Bory, S., Lecolier, A., Noirot, M., dan Joet, T. 2014. ***Expression Profiles of Key Phenylpropanoid Genes During Vanilla Planifolia Pod Development Reveal a Positive Correlation Between Pal Gene Expression and Vanillin Biosynthesis***. Plant Physiology and Biochemistry. 74: 304-314.
- Buranov, A. U. dan Mazza, G. 2009. ***Extraction and Purification of Ferulic Acid From Flax Shives, Wheat and Corn Bran by Alkaline Hydrolysis and Pressurised Solvents***. Food Chemistry. 115: 1542-1548.
- Bystrom, L.M., B.A. Lewis, A.L. Brown, E. Rodriguez, and R.L. Obendorf. 2008. ***Characterisation of Phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and Sugars by GC in Melicoccus bijugatus Jacq. 'Montgomery' fruits***. Food Chemistry. 111: 1017-1024.
- Clark, J. H. 2007. ***Green Chemistry for the Second Generation Biorefinery–Sustainable Chemical Manufacturing Based on Biomass***. J. Chem. Technol. Biotechnol. 82: 603–609.
- Chen, H., Liu, J. Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., dan Han, S. 2017. ***A Review on the Pretreatment of Lignocellulose for High-Value Chemicals***. Fuel Processing Technology. 160: 196:206.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., dan Madani, K. 2014. ***Pistacia Lentiscus Leaves as a***

Source of Phenolic Compounds: Microwave-Assisted Extraction Optimized and Compared with Ultrasound-Assisted and Conventional Solvent Extraction. Industrial Crops And Products. 61: 31-40.

Dey, T. B. dan Kuhad, R. C. 2014. **Enhanced Production and Extraction of Phenolic Compounds from Wheat by Solid-State Fermentation with *Rhizopus Oryzae* RCK2012.** Biotechnology Reports. 4: 120-127.

Dong, Z., Gu, F., Xu, F., dan Wang, Q. 2014. **Comparison of Four Kinds of Extraction Techniques and Kinetics of Microwave-Assisted Extraction of Vanillin from *Vanilla Planifolia Andrews*.** Food Chemistry. 149: 54-61.

Durmaz, S., Ozgenc, O., Boyaci, I. H., Yildiz, U. C., Dan Erisir, E. 2016. **Examination of the Chemical Changes in Spruce Wood Degraded by Brown-Rot Fungi Using FT-IR and FT-Raman Spectroscopy.** Vibrational Spectroscopy. 85: 202–207.

Eastwood, D., Floudas, D., Binder, M., Majchercyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F.O., Baker, S. E., Barry, K., Bendiksby, M., Blomentrutt, M., Coutinho, P. M., Cullen, D., De Vries, R. P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihmark, K., Kauserud, H., Kohler, A., Labutti, K., Lapidus, J. L., Lee, Y. H., Lindquist, E., Lilly, W., Lucas, S., Morin, E., Murat, C., Oguiza, J. A., Park, J., Pisabarro, A. G., Riley, R., Rosling, A., Salamov, A., Schmidt, O., Schmutz, J., Skrede, I., Stenlid, J., Wiebenga, A., Xie, X., Kues, U., Hibbett, D. S., Hoffmeister, D., Hogberg, N., Martin, F., Grigoriev, I. V., dan Watkinson, S. C., 2011. **The Plant Cell Wall Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi.** Science. 333: 762-765.

- Eriksson, K. E., Blanchette, R. A., dan Ander, P. 1990. ***Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components***. Springer-Verlag, Berlin.
- Faveri, D. D., Torre, P., Aliakbarian, B., Dominguez, J. M., Perego, P., dan Converti, A. 2007. ***Response Surface Modeling of Vanillin Production by Escherichia coli Jm109pbb1***. Biochemical Engineering Journal. 36: 268-275.
- Firdous, S., Iqbal, S., Dan Anwar, S. 2017. ***Optimization and Modeling of Glyphosate Biodegradation by a Novel Comamonas Odontotermitis P2 Through Response Surface Methodology***.
- Gallegos, A. A., Ahmad, Z. Asgher, M., Saldivar, R. P., dan Iqbal, H. M. N. 2017. ***Lignocellulose: A Sustainable Material to Produce Value-Added Products With a Zero Waste Approach—a Review***. International Journal of Biological Macromolecules. 99: 308-318.
- Gallo, M., Formato, A., Ianniello, D., Andolfi, A., Conte E., Ciaravolo, M., Varchetta, V., dan Naviglio, D. 2017. ***Supercritical Fluid Extraction of Pyrethrins from Pyrethrum Flowers (Chrysanthemum Cinerariifolium) Compared to Traditional Maceration and Cyclic Pressurization Extraction***. The Journal Of Supercritical Fluids. 119: 104-112.
- Guyenatam, B., Heeres, E. H. J., Pidko, E. A., dan Hensen, E. J. M. 2015. ***Decomposition of Lignin Model Compounds by Lewis Acid Catalysts in Water and Ethanol***. Molecular Catalysis A-Chemical. 410: 89-99.
- Harshvardhan, K., Suri, M., Goswami, A., dan Goswami, T. 2017. ***Biological Approach for the Production of***

- Vanillin From Lignocellulosic Biomass (Bambusa Tulda).** Journal Of Cleaner Production. 149: 485-490.
- Hastrup, A. C. S. 2011. **Aspect of Cellulose Degradation by Brown Rot Fungi: Involvement of Enzymatic and Non-enzymatic Decay Processes Including Oxalic Acid Regulation and Metal Sequestering.** PhD Thesis. University of Copenhagen. Denmark.
- Hastrup, A. C. S., Green III, F., Lebow, P. K., dan Jensen, B. 2012. **Enzymatic Oxalic Acid Regulation Correlated with Wood Degradation in Four Brown-Rot Fungi.** International Biodeterioration & Biodegradation. 75: 109-114.
- Hastrup, A. C. S., Jensen, B., Clause, C., dan Green III, F. 2006. **The Effect of CaCl₂ on Growth Rate, Wood Decay and Oxalic Acid Accumulation in *Serpula lacrymans* and Related Brownrot Fungi.** Holzforschung. 60: 339-345.
- Howard, R. I., Abotsi, E., Jansen, V. R. E. I., dan Howard, S. 2003. **Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production.** Biotechnol. 2: 602–19.
- Jennings, D. H. dan Bravery A. F. 1991. ***Serpula lacrymans: Fundamental Biology and Control Strategies.*** John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Jiang, G., Nowakowski, D. J., dan Bridgwater, A. V., 2010. **A Systematic Study of the Kinetics of Lignin Pyrolysis.** Thermochim. Acta 498: 61–66.
- Jonsson, L. J. dan Martin, C. 2016. **Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory by-Products and Strategies for Minimizing Their Effects.** Bioresource Technology. 199: 103-112.

- Jung, K. A., Woo, S. H., Lim, S. R., dan Park, J. M. 2015. ***Pyrolytic Production of Phenolic Compounds from the Lignin Residues of Bioethanol Processes***. Chemical Engineering Journal. 259: 107-116.
- Kahar, P., 2013. ***Synergistic effects of pretreatment process on enzymatic digestion of rice straw for efficient ethanol fermentation***. Environmental Biotechnology – New Approaches and Prospective Applications.
- Kaur, D., dan D. Chakraborty. 2013. ***Statistical Media and Process Optimization for Biotransformation of Rice Bran to Vanillin using *Pediococcus acidilactici****. Indian Journal of Experimental Biology 51: 935-943.
- Kausrud, H., Knudsen, H., Hogberg, N., dan Skrede, I. 2012. ***Evolutionary Origin, Worldwide Dispersal, and Population Genetics of the Dry Rot Fungus *Serpula lacrymans****. British Mycological Society. 26: 84-93.
- Kayalvizhi, J. dan Pandurangan, A. 2017. ***Hydrodeoxygenation of Vanillin Using Palladium on Mesoporous Kit-6 in Vapour Phase Reactor***. Molecular Catalysis. 436: 67-77.
- Kogo, T., Yoshida, Y., Koganei, K., Matsumoto, H., Watanabe, T., Ogiwara, J., dan Kasumi, T. 2017. ***Production of Rice Straw Hydrolysis Enzymes by The Fungi *Trichoderma reesei* And *Humicola insolens* Using Rice Straw as a Carbon Source***. Bioresource Technology. 233: 67-73.
- Kumar, N. dan Pruthi, V. 2014. ***Potential Applications of Ferulic Acid from Natural Sources***. Biotechnology Reports. 4: 86-93.
- Kundu, C., Jeong, S. Y., Dan Lee J. W. 2016. ***Bioethanol Production from Deacetylated Yellow Poplar***

Pretreated with Oxalic Acid Recovered Through Electrodialysis. Bioresource Technology. 208: 170-177.

- Laurichesse, S. dan Averous, L. 2014. ***Chemical Modification of Lignins: Towards Biobased Polymers.*** Progress in Polymer Science. 39: 1266-1290.
- Linh, T. N., Fujita, H., dan Sakoda, A. 2017. ***Release Kinetics of Esterified P-Coumaric Acid and Ferulic Acid from Rice Straw in Mild Alkaline Solution.*** Bioresource Technology. 232: 192-203.
- Ma, J., Zhang, K., Huang, M., Hector, S. B., Liu, B., Tong, C., Liu, Q., Zeng, J., Gao, Y., Xu, T., Liu, Y., Liu, X., dan Zhu, Y. 2016. ***Involvement of Fenton Chemistry in Rice Straw Degradation by the Lignocellulolytic Bacterium Pantoea Ananatis Sd-1.*** Biotechnology for Biofuels. 9:211.
- Matin, S. S. dan Khosrowshahi, F. M. 2017. ***Phenolic Compounds Extraction from Iranian Pomegranate (Punica Granatum) Industrial Waste Applicable to Pilot Plant Scale.*** Industrial Crops and Products. 108: 583-597.
- Martins, S., Musatto, S. I., Avila, G. M., Saenz, J. M., Ahuilar, C. N., dan Teixeira, J. A. 2011. ***Bioactive Phenolic Compounds: Production and Extraction by Solid-State Fermentation. a Review.*** Biotechnology Advances. 29: 365-373.
- Meybodi, a. A., Ebadi, A., Shafiei, S., Khatee, A. R., Dan Rostampour, M. 2014. ***Modeling and Optimization of Antidepressant Drug Fluoxetine Removal in Aqueous Media by Ozone/H2O2 Process: Comparison of Central Composite Design and Artificial Neural Network Approaches.*** The Taiwan Institute of Chemical Engineers.

- Miller, G. L. 1959. ***Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar***. *J. Anal. Chem.* 31: 300-310
- Molina, A. P., Capote, F. P., dan Castro, M. D. L. D. 2012. ***Comparison of Extraction Methods for Exploitation of Grape Skin Residues from Ethanol Distillation***. *Talanta*. 101: 292-298.
- Monrroy, M., Ortega, I., Ramirez, M., Baeza, J., dan Freer, J. 2011. ***Structural Change in Wood by Brown Rot Fungi And Effect on Enzymatic Hydrolysis***. *Enzyme and Microbial Technology*. 49: 472-477.
- Montgomery, D. 2009. ***Design Analysis of Experiment 5th Edition***. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Mustafa, A. M., Poulsen, T. G., dan Sheng, K. 2016. ***Fungal Pretreatment of Rice Straw with Pleurotus Ostreatus and Trichoderma Reesei to Enhance Methane Production Under Solid-State Anaerobic Digestion***. *Applied Energy*. 180: 661-671.
- Nappu, M Basir. 2013. ***Sebaran Potensi Limbah Tanaman Padi dan Jagung Serta Pemanfaatannya di Sulawesi Selatan***. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian. Makasar.
- Niemenmaa, O. 2008. ***Monitoring of Fungal Growth and Degradation of Wood***. Yliopistopaino. Helsinki.
- Oliveira, C. F. D., Giordani, D., Gurak, P. D., Olivera, F. C., dan Marczak, L. D. F. 2015. ***Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel Using Moderate Electric Field and Conventional Heating Extraction Methods***. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 29: 201-208.
- Oliveira, L. S., Santana, A. L. B. D., Maranhão, C. A., De Miranda, R. D.C. M., Galvão De Lima, V. L. A., Da Silva,

- S. I., Nascimento, M. S., dan Bieber, L. 2010. ***Natural Resistance Of Five Woods to Phanerochaete Chrysosporium Degradation.*** Int. Biodeterior. Biodegrad. 64: 711-715.
- O'sullivan, A. C. 1997. ***Cellulose: the Structure Slowly Unravels.*** Cellulose. 4: 173-207.
- Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., dan Johnson, D. K. 2010. ***Cellulose Crystallinity Index: Measurement Techniques and Their Impact on Interpreting Cellulase Performance.*** Biotechnol and Biofuels. 3-10.
- Perez J., Munos-Dorado J. and De la Rubia T. And Martinez J. 2002. ***Biodegradation and Biological Treatment of Cellulose, Hemicellulose and Lignin.*** International Microbiology 5: 53-63.
- Pitt, J. I. dan Hocking, A. D. 2009. ***Fungi and Food Spoilage.*** Springer. New York.
- Qu. W., Pan. Z., dan Ma. H. 2010. ***Extraction Modeling and Activities of Antioxidants from Pomegranate Marc.*** Journal of Food Engineering. 99: 16–23.
- Rasoamandrary, N., Fernandes, A. M., Bashari, M., Masamba, K., dan Xueming, X. 2013. ***Improved Extraction of Vanillin 4-Hydroxy-3-Methoxybenzaldehyde from Cured Vanilla Beans Using Ultrasound Assisted Extraction: a Comparison of Ultrasound-Assisted and Hot Water Bath Extraction.*** Akademik Gida. 11: 6-12.
- Ravindran, R. dan Jaiswal, A. K. 2016. ***A Comprehensive Review on Pre-Treatment Strategy for Lignocellulosic Food Industry Waste: Challenges and Opportunities.*** Bioresource Technology. 199: 92-102.

- Ray, M. J., Leak, D. J., Spanu, P. D., dan Murphy, R. J. 2010. ***Brown Rot Fungal Early Stage Decay Mechanism as a Biological Pretreatment for Softwood Biomass in Biofuel Production***. Biomass Bioenergy. 34: 1257–1262.
- Rodriguez, J. F., Erdocia, X., Sanchez, C., Alriols, M. G., Dan Labidi, J. 2017. ***Lignin Depolymerization for Phenolic Monomers Production by Sustainable Processes***. Journal of Energy Chemistry. 000: 1-10.
- Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Morales, P., dan Ferreira, I. C. F. R. 2017. ***Floral Parts of Gomphrena Globosa L. as a Novel Alternative Source of Betacyanins: Optimization of the Extraction Using Response Surface Methodology***. Food Chemistry. 229: 223-234.
- Sanchez, C. 2009. ***Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi***. Biotechnology Advances. 27: 185-194.
- Schilling, J. S. dan Jellison, J. 2005. ***Oxalate Regulation by Two Brown Rot Fungi Decaying Oxalate-Amended and Non-Amended Wood***. Holzforschung. 59: 681–688.
- Seifollahi, Z. dan Kelishami, A. R. 2017. ***Diclofenac Extraction from Aqueous Solution by an Emulsion Liquid Membrane: Parameter Study and Optimization Using the Response Surface Methodology***. Journal of Molecular Liquid. 231: 1-10.
- Setiarto, R. H. B. 2013. **Prospek dan Potensi Pemanfaatan Lignoselulosa Jerami Padi Menjadi Kompos, Silase dan Biogas Melalui Fermentasi Mikroba**. Selulosa. 32: 51-66.
- Shakeel, F., Haq, N., dan Siddiqui, N. A. 2015. ***Solubility and Thermodynamic Function of Vanillin in Ten Different***

Environmentally Benign Solvents. Food Chemistry. 180: 255-248.

Shen, Y., and C. Han. 2014. **Determination Of Vanillin, Ethyl Vanillin, And Coumarin In Infant Formula By Liquid Chromatography-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry**. 97 :679–686.

Sindhu, R., Binod, P., dan Pandey, A. 2016. ***Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass – an Overview***. Bioresource Technology. 199: 76-82.

Singleton, V. L. dan Rossi, J. A. J. 1965. ***Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents***. American Journal Enology Viticulture. 16: 144-158.

Sumardjo, D. 2008. **Pengantar Kimia**. EGC. Jakarta.

Sun, S. N., Cao, X. F., Xu, F., Sun, R. C., Jones, G. L., dan Baird, M. 2014. ***Structure and Thermal Property of Alkaline Hemicelluloses from Steam Exploded Phyllostachys Pubescens***. Carbohydr. Polym. 101: 1191–1197.

Varela, E. dan Tien, M. 2003. ***Effect of pH and Oxalate on Hydroquinone-Derived Hydroxyl Radical Formation During Brown Rot Wood Degradation***. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6025–6031.

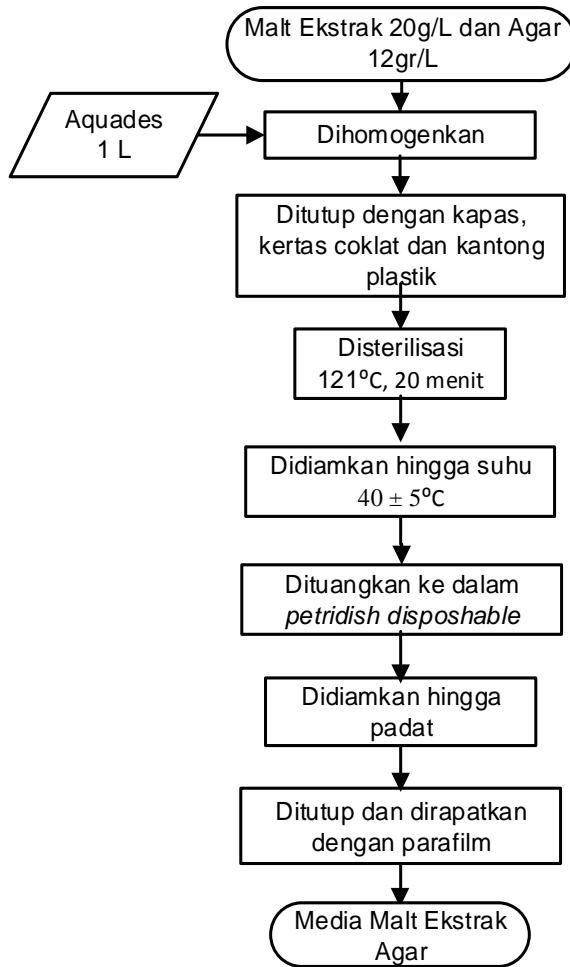
Wang, T., Zhang, R., Peng, L., Ai, Y., Dan Lu, Q. 2017. ***Pyrolysis Characteristic Changes of Poplar Wood During Natural Decay***. Analytical and Applied Pyrolysis. 128: 257–260.

Weigenand, O., Humar, M., Daniel, G., Militz, H., dan Mai, C. 2008. ***Decay Resistance of Wood Treated with Amino Silicon Compounds***. Holzforschung. 62: 112-118.

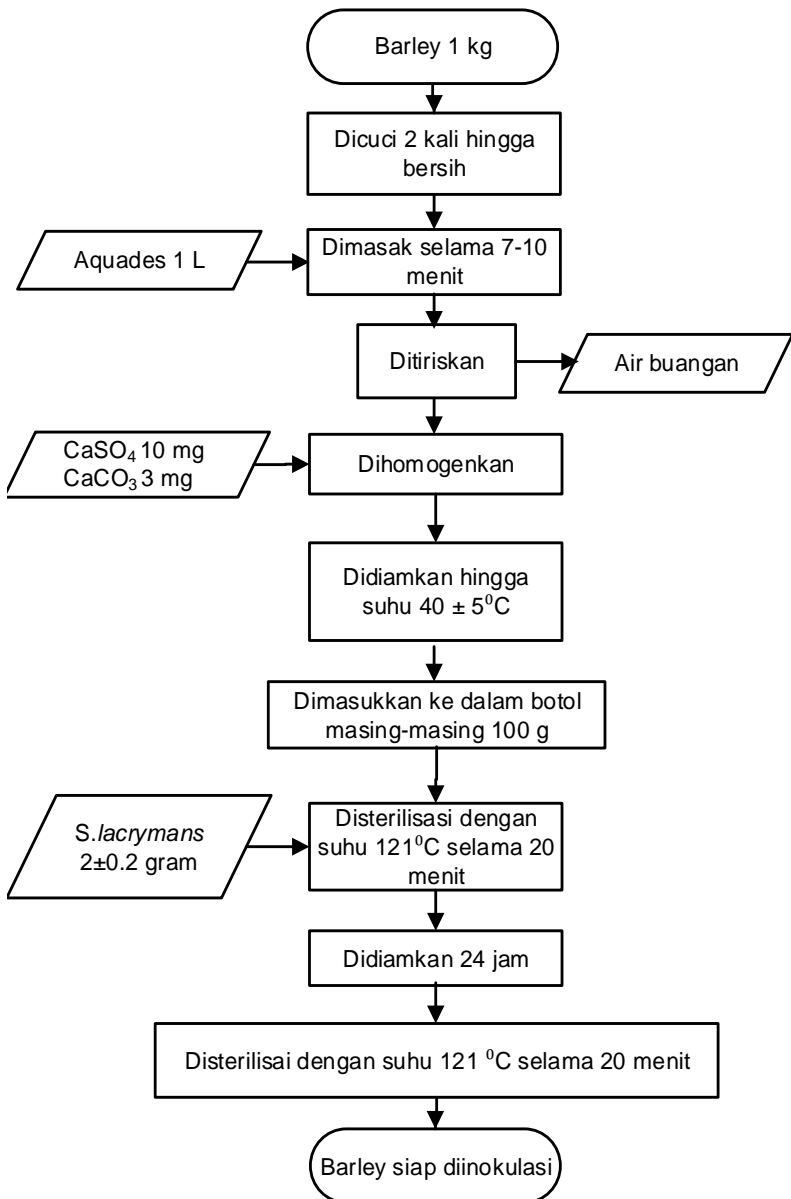
Yulianto, M. E. Diyono, I., Hartati, I., Rustam, S. N., dan Fiqih, P. J. 2009. **Pengembangan Hidrolisis Enzimatik Biomassa Jerami Padi untuk Produksi Bioetanol.** Nasional. 14: 66-73.

Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Zhou, G., Dan Yuan, Z. 2016. ***Liquid Hot Water Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production Accompanying with High Valuable Products.*** Bioresource Technology. 199: 68-75.

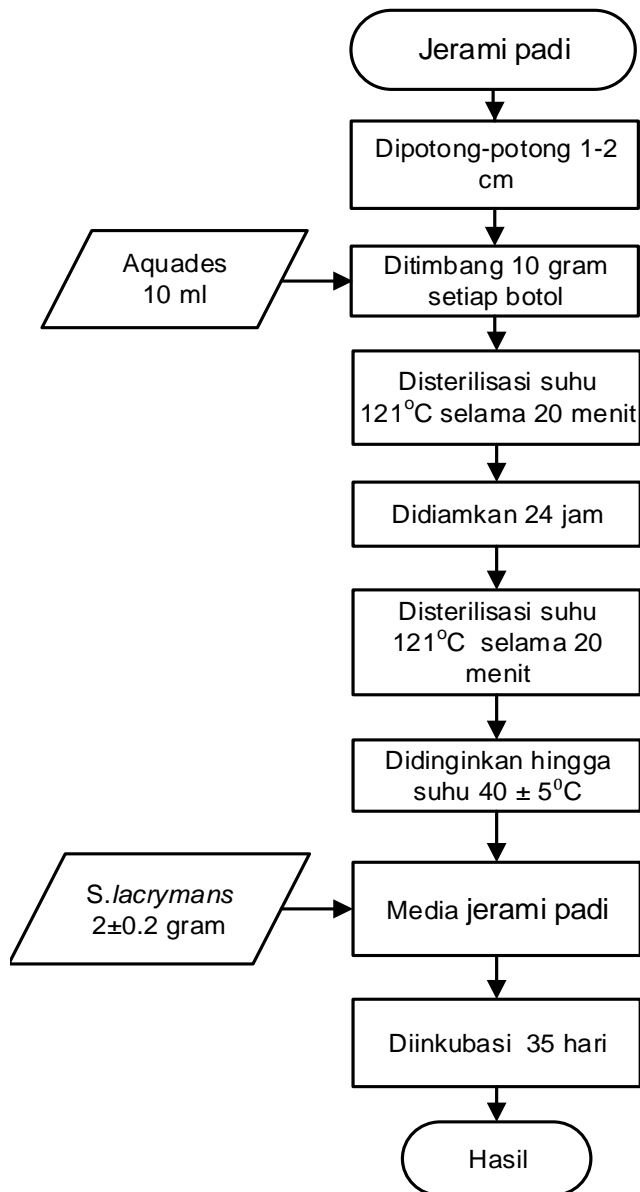
Lampiran 1. Pembuatan Media *Malt Extract Agar* (MEA)



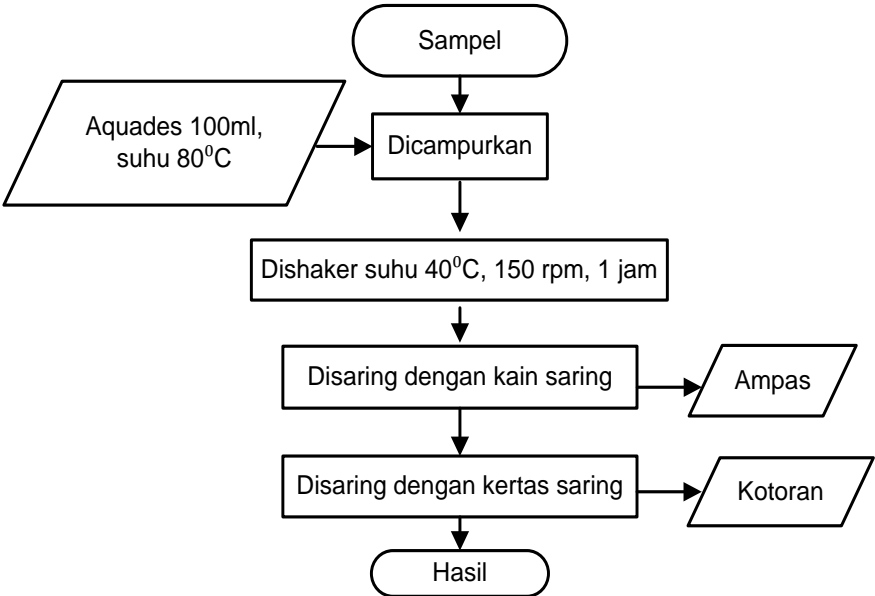
Lampiran 2. Pembuatan *Grain Spawn*



Lampiran 3. *Pretreatment* pada Jerami Padi

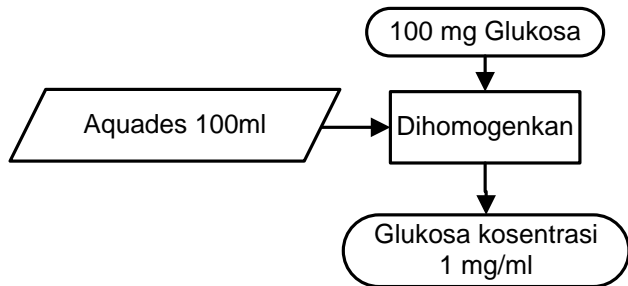


Lampiran 4. Proses Ekstraksi Jerami Padi Menggunakan Aquades

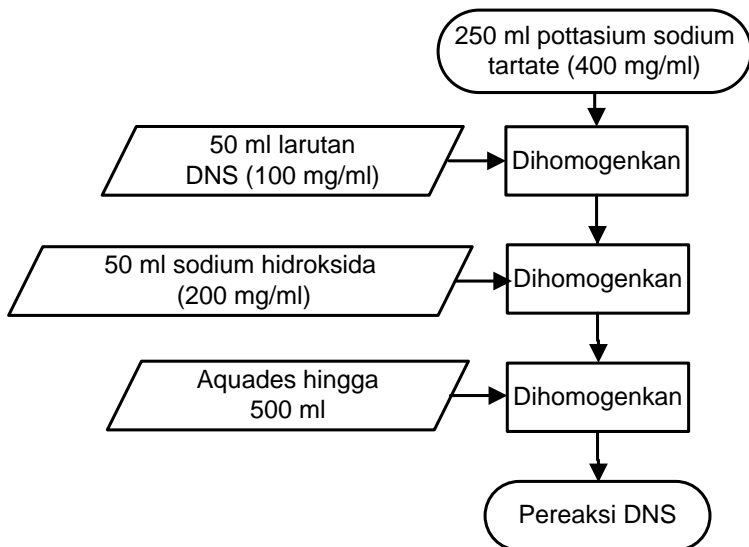


Lampiran 5. Pembuatan Larutan Glukosa, Larutan DNS, Larutan DNS dengan Glukosa dan Larutan DNS dengan aquades

A. Pembuatan Larutan Glukosa

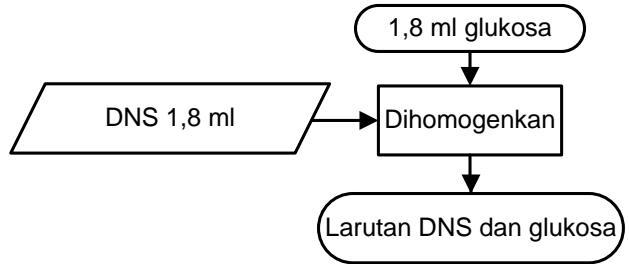


B. Laruta DNS

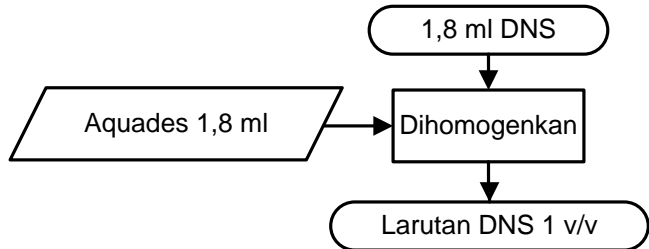


Lampiran 5. Pembuatan Larutan Glukosa, Larutan DNS, Larutan DNS dengan Glukosa dan Larutan DNS dengan aquades (lanjutan)

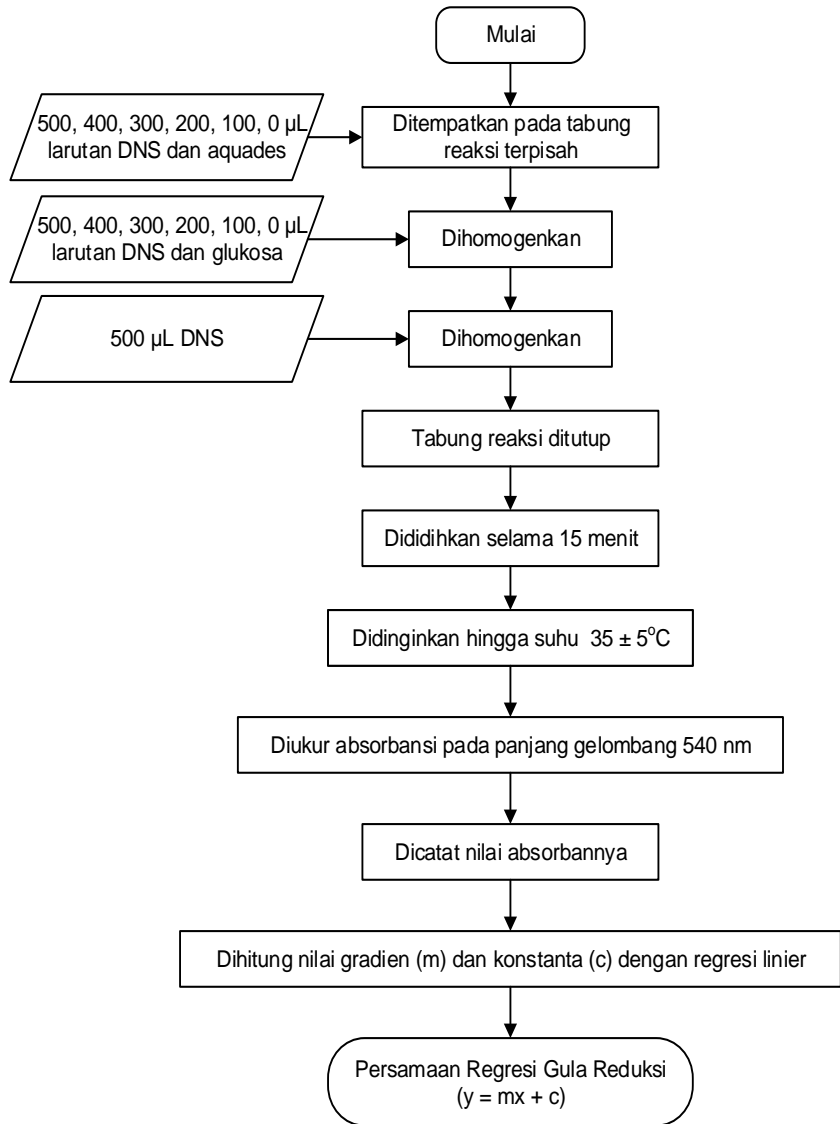
C. Larutan DNS dengan Glukosa



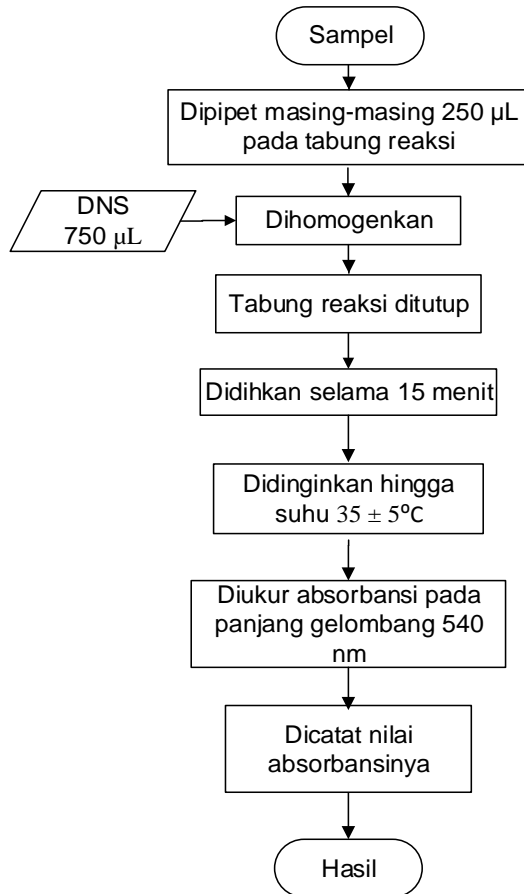
D. Larutan DNS dengan Aquades



Lampiran 6. Pembuatan dan Pengukuran Larutan Standar Gula Reduksi

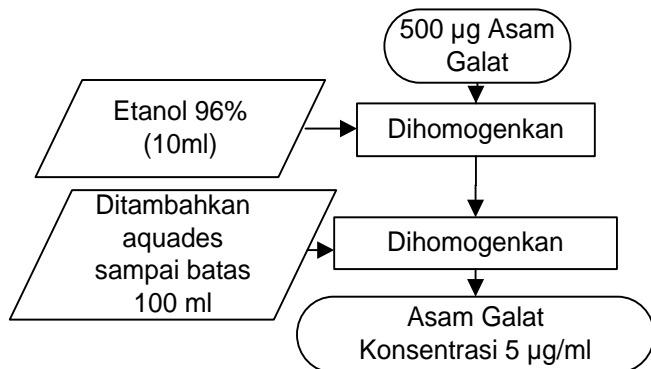


Lampiran 7. Pengukuran Gula Reduksi pada Ekstrak Jerami Padi

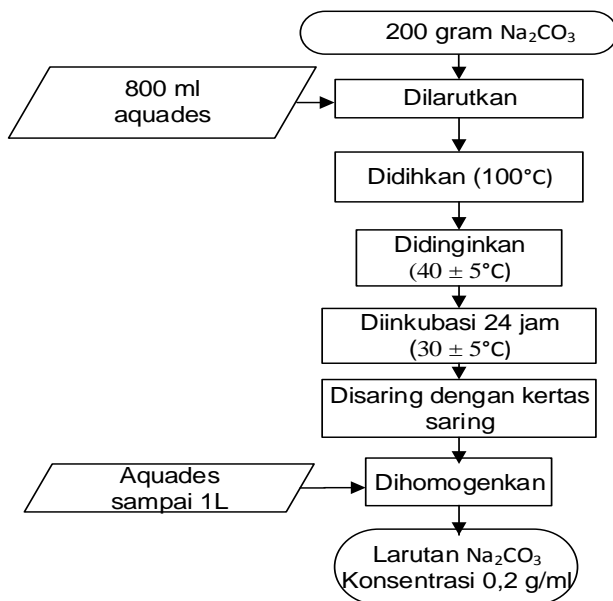


Lampiran 8. Pembuatan Larutan Asam Galat dan Sodium Karbonat

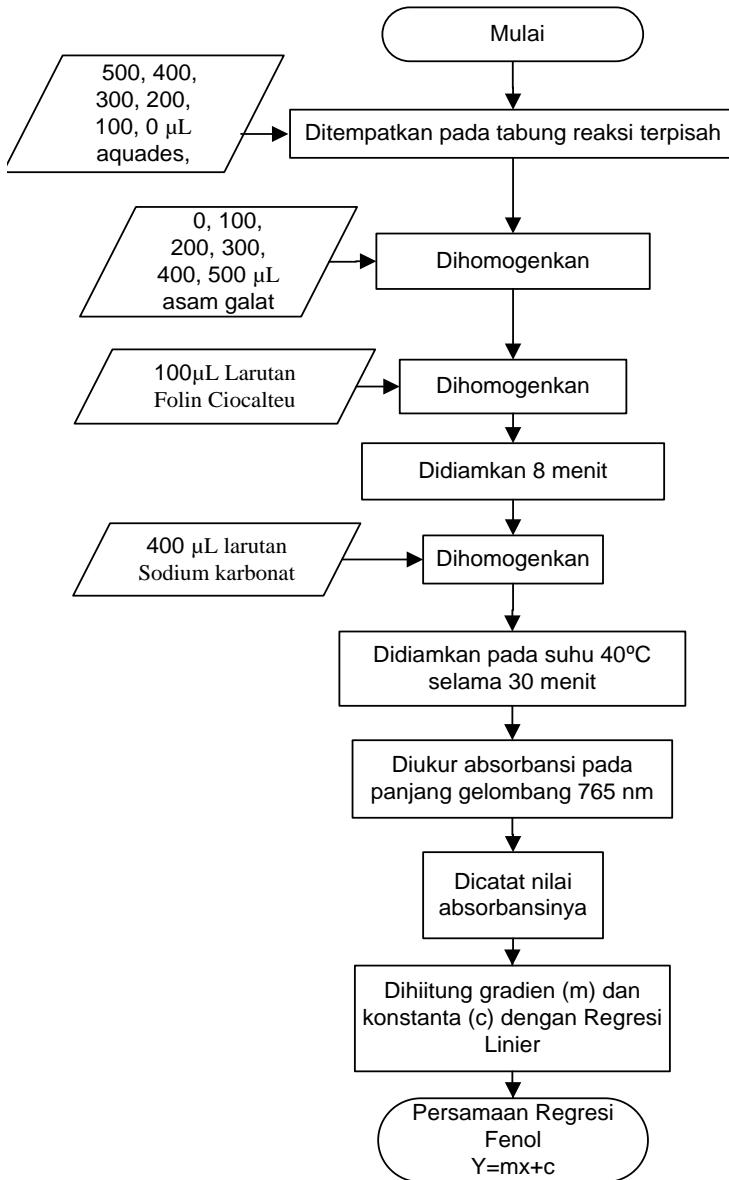
a. Larutan Asam Galat



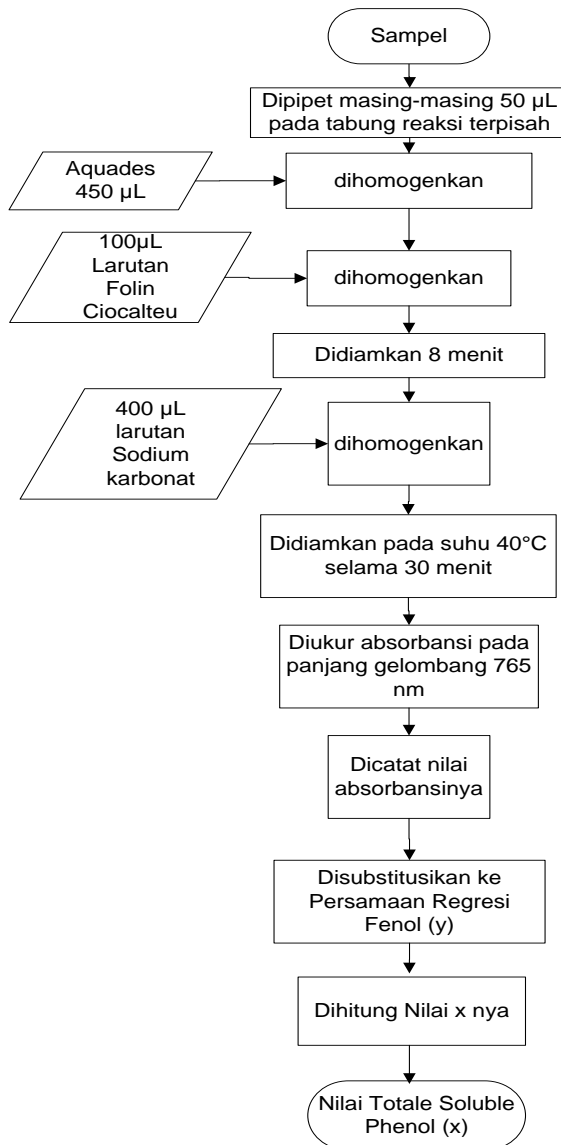
b. Larutan Sodium Karbonat



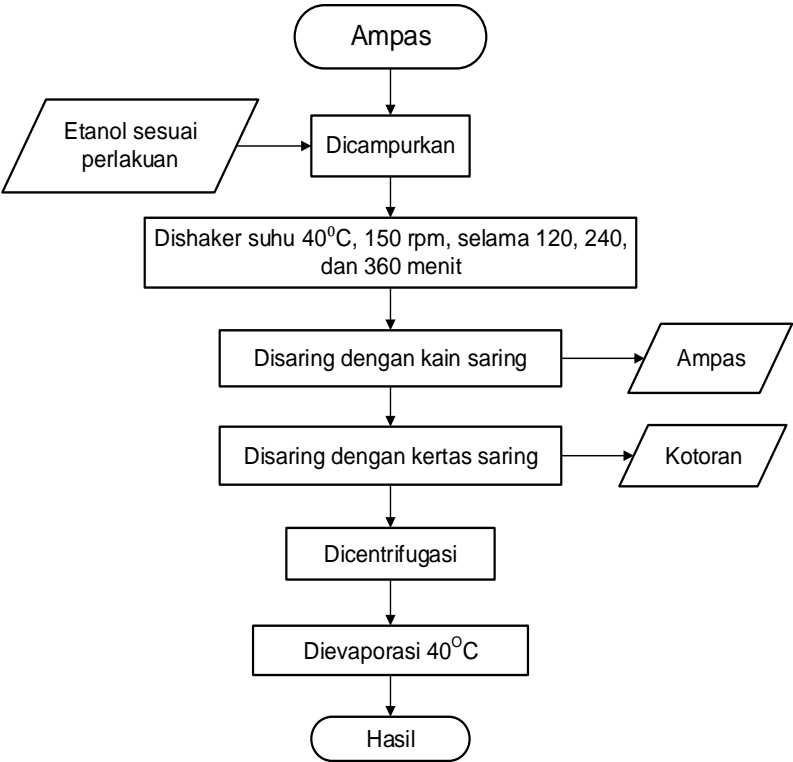
Lampiran 9. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fenol



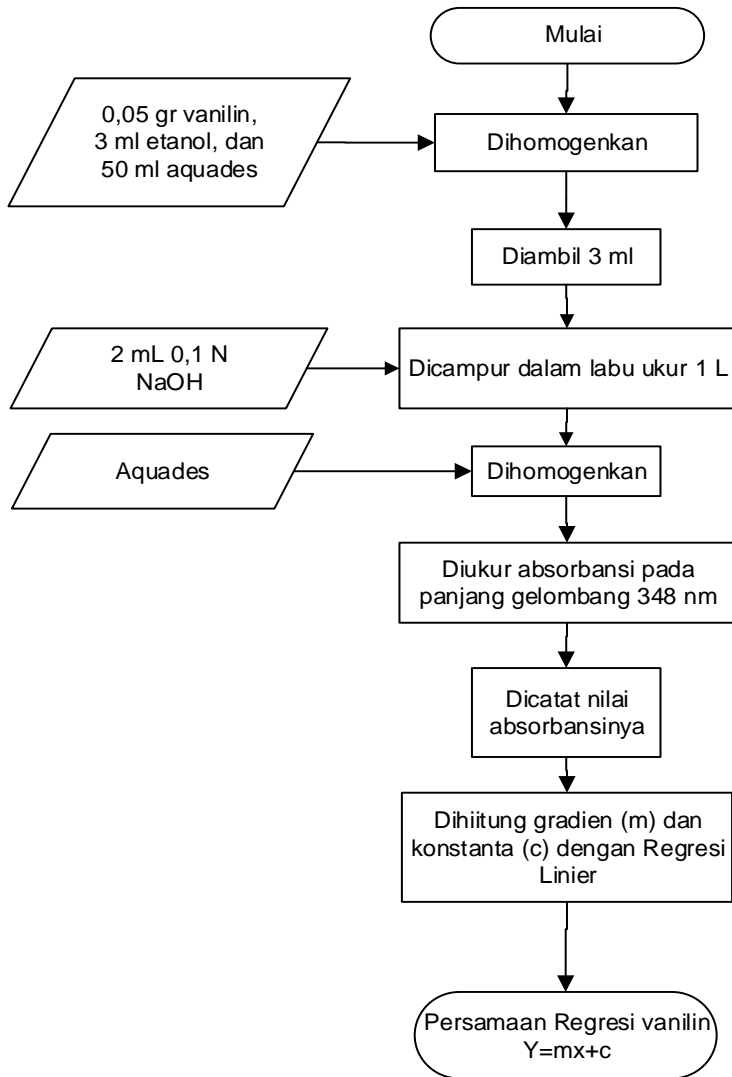
Lampiran 10. Pembuatan dan Pengukuran Fenol pada Ekstrak Jerami Padi



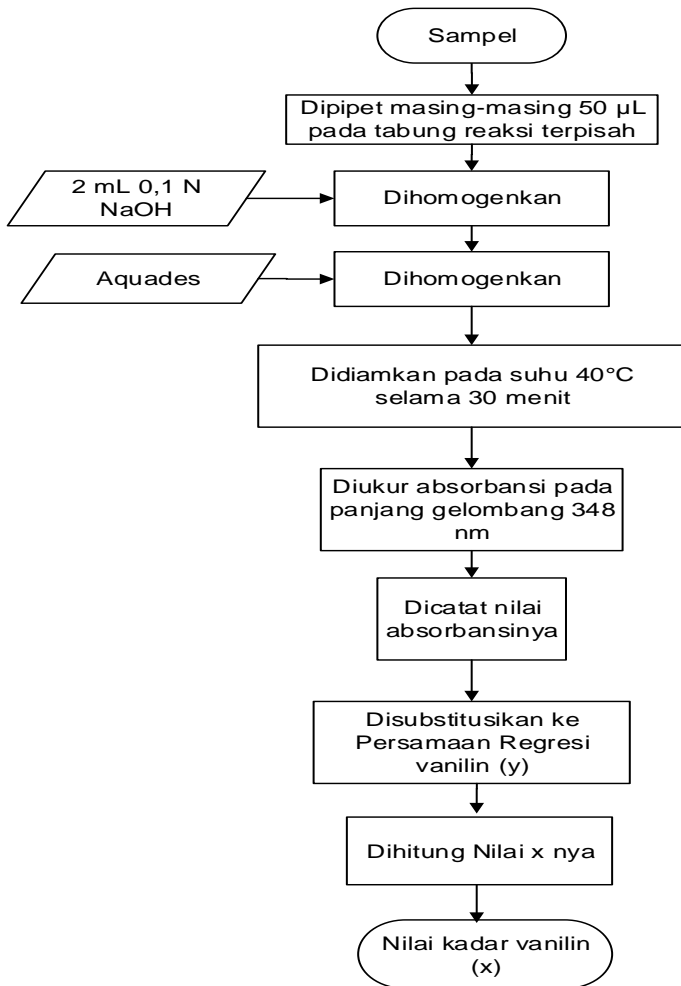
Lampiran 11. Proses Ekstraksi Jerami Padi Menggunakan Etanol



Lampiran 12. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Vanilin



Lampiran 13. Pembuatan dan Pengukuran vanilin dari Ekstrak Jerami Padi



Lampiran 14. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat kadar vanilin

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F | |
|-------------------------|----------------|----------|--------------|--------------|--------------------|------------------|
| Mean vs Total | 122.77 | 1 | 122.77 | | | |
| Linear vs Mean | 0.90 | 2 | 0.45 | 0.052 | 0.9494 | |
| 2FI vs Linear | 4.064E-003 | 1 | 4.064E-003 | 4.264E-004 | 0.9840 | |
| <u>Quadratic vs 2FI</u> | <u>81.41</u> | <u>2</u> | <u>40.70</u> | <u>65.08</u> | <u>< 0.0001</u> | <u>Suggested</u> |
| Cubic vs Quadra | 0.41 | 2 | 0.20 | 0.26 | 0.7840 | Aliased |
| Residual | 3.97 | 5 | 0.79 | | | |
| Total | 209.46 | 13 | 16.11 | | | |

Lack of Fit Tests

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F | |
|------------------|----------------|----------|-------------|-------------|------------------|------------------|
| Linear | 82.93 | 6 | 13.82 | 19.36 | 0.0064 | |
| 2FI | 82.93 | 5 | 16.59 | 23.24 | 0.0047 | |
| <u>Quadratic</u> | <u>1.52</u> | <u>3</u> | <u>0.51</u> | <u>0.71</u> | <u>0.5942</u> | <u>Suggested</u> |
| Cubic | 1.12 | 1 | 1.12 | 1.56 | 0.2792 | Aliased |
| Pure Error | 2.86 | 4 | 0.71 | | | |

Model Summary Statistics

| Source | Std. Dev. | R-Squared | Adjusted R-Squared | Predicted R-Squared | PRESS | |
|------------------|-------------|---------------|--------------------|---------------------|--------------|------------------|
| Linear | 2.93 | 0.0103 | -0.1876 | -0.5702 | 136.11 | |
| 2FI | 3.09 | 0.0104 | -0.3195 | -1.4198 | 209.76 | |
| <u>Quadratic</u> | <u>0.79</u> | <u>0.9495</u> | <u>0.9134</u> | <u>0.8236</u> | <u>15.29</u> | <u>Suggested</u> |
| Cubic | 0.89 | 0.9542 | 0.8900 | 0.1241 | 75.93 | Aliased |

Lampiran 14. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat kadar vanilin (lanjutan)

Response 1 kadar vanilin

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F | |
|-----------------|----------------|----|-------------|------------|------------------|-----------------|
| Model | 82.31 | 5 | 16.46 | 26.32 | 0.0002 | significant |
| A-volume etanoi | 0.023 | 1 | 0.023 | 0.036 | 0.8545 | |
| B-lama ekstrak: | 0.87 | 1 | 0.87 | 1.40 | 0.2759 | |
| AB | 4.064E-003 | 1 | 4.064E-003 | 6.498E-003 | 0.9380 | |
| A ² | 59.17 | 1 | 59.17 | 94.60 | < 0.0001 | |
| B ² | 32.25 | 1 | 32.25 | 51.57 | 0.0002 | |
| Residual | 4.38 | 7 | 0.63 | | | |
| Lack of Fit | 1.52 | 3 | 0.51 | 0.71 | 0.5942 | not significant |
| Pure Error | 2.86 | 4 | 0.71 | | | |
| Cor Total | 86.69 | 12 | | | | |

| | | | |
|-----------|-------|----------------|--------|
| Std. Dev. | 0.79 | R-Squared | 0.9495 |
| Mean | 3.07 | Adj R-Squared | 0.9134 |
| C.V. % | 25.73 | Pred R-Squared | 0.8236 |
| PRESS | 15.29 | Adeq Precision | 10.996 |

| Factor | Coefficient Estimate | df | Standard Error | 95% CI Low | 95% CI High | VIF |
|-----------------|----------------------|----|----------------|------------|-------------|------|
| Intercept | 6.19 | 1 | 0.35 | 5.36 | 7.03 | |
| A-volume etanol | -0.053 | 1 | 0.28 | -0.71 | 0.61 | 1.00 |
| B-lama ekstrak: | 0.33 | 1 | 0.28 | -0.33 | 0.99 | 1.00 |
| AB | -0.032 | 1 | 0.40 | -0.97 | 0.90 | 1.00 |
| A ² | -2.92 | 1 | 0.30 | -3.63 | -2.21 | 1.02 |
| B ² | -2.15 | 1 | 0.30 | -2.86 | -1.44 | 1.02 |

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned} \text{kadar vanilin} = & +6.19 \\ & -0.053 * A \\ & +0.33 * B \\ & -0.032 * A * B \\ & -2.92 * A^2 \\ & -2.15 * B^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{kadar vanilin} = & -14.76740 \\ & +0.58380 * \text{volume etanol} \\ & +0.075058 * \text{lama ekstraksi} \\ & -1.32812E-005 * \text{volume etanol} * \text{lama ekstraksi} \\ & -7.29088E-003 * \text{volume etanol}^2 \\ & -1.49528E-004 * \text{lama ekstraksi}^2 \end{aligned}$$

Lampiran 15. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat *yield* vanilin

| Sequential Model Sum of Squares [Type I] | | | | | |
|--|----------------|----|-------------|------------|--------------------|
| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F |
| Mean vs Total | 16.60 | 1 | 16.60 | | |
| Linear vs Mean | 0.10 | 2 | 0.050 | 0.028 | 0.9725 |
| 2FI vs Linear | 1.525E-004 | 1 | 1.525E-004 | 7.644E-005 | 0.9932 |
| Quadratic vs 2 | 17.47 | 2 | 8.73 | 125.07 | < 0.0001 Suggested |
| Cubic vs Quad | 0.064 | 2 | 0.032 | 0.38 | 0.7033 Aliased |
| Residual | 0.42 | 5 | 0.085 | | |
| Total | 34.66 | 13 | 2.67 | | |

Lack of Fit Tests

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F |
|------------|----------------|----|-------------|---------|------------------|
| Linear | 17.57 | 6 | 2.93 | 30.08 | 0.0027 |
| 2FI | 17.57 | 5 | 3.51 | 36.09 | 0.0020 |
| Quadratic | 0.099 | 3 | 0.033 | 0.34 | 0.7986 Suggested |
| Cubic | 0.035 | 1 | 0.035 | 0.36 | 0.5798 Aliased |
| Pure Error | 0.39 | 4 | 0.097 | | |

| Response 2 kandungan vanilin | | | | | |
|--|----------------|----|-------------|------------|------------------------|
| ANOVA for Response Surface Quadratic model | | | | | |
| Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III] | | | | | |
| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F |
| Model | 17.57 | 5 | 3.51 | 50.32 | < 0.0001 significant |
| A-volume eta | 7.762E-006 | 1 | 7.762E-006 | 1.111E-004 | 0.9919 |
| B-lama ekstr | 0.10 | 1 | 0.10 | 1.44 | 0.2692 |
| AB | 1.525E-004 | 1 | 1.525E-004 | 2.184E-003 | 0.9640 |
| A ² | 10.85 | 1 | 10.85 | 155.32 | < 0.0001 |
| B ² | 8.89 | 1 | 8.89 | 127.23 | < 0.0001 |
| Residual | 0.49 | 7 | 0.070 | | |
| Lack of Fit | 0.099 | 3 | 0.033 | 0.34 | 0.7986 not significant |
| Pure Error | 0.39 | 4 | 0.097 | | |
| Cor Total | 18.06 | 12 | | | |

Lampiran 15. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat *yield* vanilin (lanjutan)

| | | | |
|-----------------|-------|---------------|--------|
| Std. Dev. | 0.26 | R-Squared | 0.9729 |
| Mean | 1.13 | Adj R-Squared | 0.9536 |
| C.V. % | 23.39 | Pred R-Square | 0.9271 |
| PRESS | 1.32 | Adeq Precisor | 13.918 |
| -2 Log Likeliho | -5.76 | BIC | 9.63 |
| | | AICc | 20.24 |

| | Coefficient | | Standard | 95% CI | 95% CI | |
|----------------|-------------|----|----------|--------|--------|------|
| Factor | Estimate | df | Error | Low | High | VIF |
| Intercept | 2.59 | 1 | 0.12 | 2.31 | 2.87 | |
| A-volume etan | -9.850E-004 | 1 | 0.093 | -0.22 | 0.22 | 1.00 |
| B-lama ekstrak | 0.11 | 1 | 0.093 | -0.11 | 0.33 | 1.00 |
| AB | -6.175E-003 | 1 | 0.13 | -0.32 | 0.31 | 1.00 |
| A ² | -1.25 | 1 | 0.10 | -1.49 | -1.01 | 1.02 |
| B ² | -1.13 | 1 | 0.10 | -1.37 | -0.89 | 1.02 |

Final Equation in Terms of Coded Factors: Final Equation in Terms of Actual Factors:

| | |
|------------------------|--|
| kandungan vanilin = | kandungan vanilin = |
| +2.59 | -7.16872 |
| -9.850E-004 * A | +0.25032 * volume etanol |
| +0.11 * B | +0.038710 * lama ekstraksi |
| -6.175E-003 * AB | -2.57292E-006 * volume etanol * lama ekstraksi |
| -1.25 * A ² | -3.12187E-003 * volume etanol ² |
| -1.13 * B ² | -7.84842E-005 * lama ekstraksi ² |

Lampiran 16. Dokumentasi Penelitian



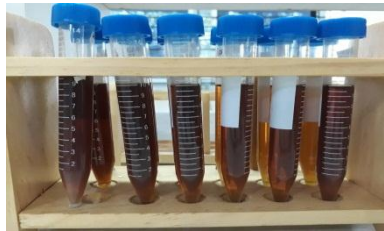
Persiapan jerami padi



Jerami padi inkubasi 35 hari



Proses filtrasi



Ekstrak jerami padi dengan pelarut etanol sebelum sentrifugasi



Ekstrak jerami padi dengan pelarut etanol setelah sentrifugasi



Proses evaporasi